

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Mesentsefaalse astrotsüütidest pärineva närvikasvufaktori (MANF) interaktsioonid  
šaperoniga BiP ning madalmolekulaarsete ühenditega**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kristofer Nõges

Juhendajad MSc Ave Eesmaa  
professor Mart Saarma  
professor Ülo Langel

TARTU 2017

## **Mesentsefaalse astrotsüütidest pärineva närvikasvufaktori (MANF) interaktsioonid šaperoniga BiP ning madalmolekulaarsete ühenditega**

Bakalaureusetöö

Kristofer Nöges

**Lühikokkuvõte.** Üha kasvav hulk teadustulemusi viitavad, et MANF ja tema paraloog CDFN on erinevalt teistest närvikasvufaktoritest lokaliseeritud ER-i. Lisaks on MANF-i ekspressioon ja sekretsioon on reguleeritud UPR-i poolt. Seetõttu võib oletada, et MANF-il on bioloogiliselt oluline funktsioon ER-is. Käesoleva uurimistööga selgitati välja, et šaperon BiP-i ja närvikasvufaktori MANF-i vahel toimub otsene interaktsioon afiinsusega  $K_D = 675 \pm 38$  nM ning see ei ole  $Ca^{2+}$ -sõltuv nagu Glembotski koos oma kaastöötajatega 2012. aasta teadusartiklis arvasid, vaid sõltub ATP-st. Lisaks uuriti MANF-i interaktsioone oluliste ER-i madalmolekulaarsete ühenditega - ADP, ATP, AMP-PNP ning  $Ca^{2+}$  ionidega. Siinses töös kirjeldatud andmed viitavad esmakordselt, et MANF on võimeline siduma nukleotiide, seevastu interaktsioon  $Ca^{2+}$  ionidega puudub täielikult.

### **CERCS teaduseriala: P310 Proteiinid, ensümolooia**

Märksõnad: närvikasvufaktor, MANF, šaperon, GRP-78, BiP, MST, ER stress, CDFN

## **Interactions of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) with chaperone BiP and low-molecular-weight molecules**

Bachelor's thesis

Kristofer Nöges

**Abstract.** Increasing evidence indicates that unlike other classical neurotrophic factors, MANF and its paralog CDFN are localized in the endoplasmic reticulum (ER). In addition, the expression and the secretion of MANF are regulated by unfolded protein response (UPR). It has therefore been suggested that MANF may have an important biological function in the ER. The aim of this work was to study MANF protein-protein interaction with BiP and with important low-molecular-weight molecules of the ER - ADP, ATP, AMP-PNP and  $Ca^{2+}$ . We show for the first time that MANF and BiP interact directly with the affinity of  $675 \pm 38$  nM. We have found that contrary to what has been reported before by Glembotski *et al.*, 2012, the interaction of MANF and BiP is  $Ca^{2+}$ -independent. Instead, the interaction between MANF and BiP is ATP-dependent. In addition, we discovered that MANF interacts directly with ADP, ATP and AMP-PNP with the binding affinities ranging from 400 to 1400  $\mu$ M. No interaction between MANF and  $Ca^{2+}$  was observed.

### **CERCS research specialization: P310 Proteins, enzymology**

Keywords: neurotrophic factor, MANF, chaperone, GRP-78, BiP, MST, ER stress, CDFN

## Sisukord

<b>Kasutatud lühendid .....</b>	<b>4</b>
<b>Sissejuhatus .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Närvikasvufaktorid.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Mesentsefaalne astrotsüütide närvikasvufaktor .....	8
1.1.2. Tserebraalne dopamiini närvikasvufaktor.....	11
<b>1.2. Endoplasmaatiline retiikulum .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. Mittevoltunud valkude vastus .....	16
1.2.2. Immuunoglobuliin siduv valk .....	17
<b>2. Eksperimentaalosa.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Töö eesmärgid .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Materjal ja meetodika .....</b>	<b>20</b>
2.2.1. Töös kasutatud valgud .....	20
2.2.2. BiP-i märkimine Alexa-647 fluorofooriga.....	20
2.2.3. MANF-i märkimine Alexa-647 fluorofooriga .....	21
2.2.4. Mikroskaalas termoforees.....	21
<b>2.3. Tulemused.....</b>	<b>26</b>
2.3.1 MANF-i kontsentratsiooni mõõtmistulemused.....	26
2.3.2 Märgitud BiP-i töölahjenduse määramine .....	26
2.3.3 Mikroskaalas termoforeesi mõõtmistulemused .....	27
<b>Arutelu .....</b>	<b>35</b>
<b>Kokkuvõte.....</b>	<b>37</b>
<b>Summary.....</b>	<b>38</b>
<b>Tänuõnad .....</b>	<b>38</b>
<b>Kirjanduse loetelu.....</b>	<b>39</b>
<b>Kasutatud veebiaadressid .....</b>	<b>51</b>
<b>Lihtlitsents .....</b>	<b>52</b>

## Kasutatud lühendid

6-OHDA	6-hüdroksüdopamiin ( <i>6-hydroxydopamine</i> )
ATF4	Transkriptsiooni aktiveeriv faktor 4 ( <i>activating transcription factor 4</i> )
ATF6	Transkriptsiooni aktiveeriv faktor 6 ( <i>activating transcription factor 6</i> )
Bax	Pro-apoptootiline Bcl-2-assotsieerunud valk X ( <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
BiP	Immuunoglobuliine siduv valk ( <i>immunoglobulin binding protein</i> )
cDNA	Komplementaarne DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDNF	Tserebraalne dopamiini närvikasvufaktor ( <i>cerebral dopamine neurotrophic factor</i> )
eIF2 $\alpha$	Eukarüootse initsiatsiooni faktori 2 alfa subühik ( <i>eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit</i> )
ERdj	ER-is lokaliseeruv Dna-J-le sarnane valk ( <i>ER-localized Dna-J-like protein</i> )
GDNF	Gliia närvikasvufaktor ( <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> )
GRP-78	78kDa glükoosi poolt reguleeritud valk ( <i>78 kDa glucose-regulated protein</i> )
GRP-94	94kDa glükoosi poolt reguleeritud valk ( <i>94kDa glucose-regulated protein</i> )
Hsp70	Kuumavalk 70 ( <i>heat shock protein 70</i> )
IHC	Kudede immuunvärvimine ( <i>immunohistochemistry</i> )
IRE1	Inositooli vajav ensüüm 1 ( <i>inositol-requiring enzyme 1</i> )
KDEL	ER-is lokaliseeruvate valkude konserveerunud signaaljärjestus Lys-Asp-Glu-Leu
KDEL <sub>R</sub>	KDEL retseptor ( <i>KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor</i> )
MANF	Mesentsefaalne astrotsüütide närvikasvufaktor ( <i>mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i> )
MPTP	1-metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetrahüdropüridiin ( <i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i> )
MST	Mikroskaalas termoforees ( <i>microscale thermophoresis</i> )
NRTN	Neurturiin ( <i>neurturin</i> )



PERK	PKR-le sarnanev endoplasmaatilise retiikulumi kinaas ( <i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i> )
PKR	Kaheaahelalise RNA poolt aktiveeritav kinaas ( <i>double-stranded RNA-activated protein kinase</i> )
SAPLIPs	Saposiini sarnased valgud ( <i>saposin-like proteins</i> )
UPR	Mittevoltunud valkude vastus ( <i>unfolded protein response</i> )
XBP1	X-järjestusega seonduv valk 1 ( <i>x-box binding protein 1</i> )

## Sissejuhatus

Neurodegeneratiivsete haiguste esinemissageduse tõus on tänapäeva ühiskonnas aina süvenev probleem. Esinemissageduse tõusu põhjused on siiani ebaselged, kuid arvatakse, et oma panuse annab sellele kasvav keskmine eluiga. Kõige tuntumad neurodegeneratiivsed haigused on Parkinsoni ja Alzheimeri tõbi. Rahvusvahelise Alzheimeri Assotsiatsiooni 2016. aasta aruande kohaselt on maailmas hinnanguliselt 47 miljonit Alzheimeri haiget (Alzheimer's Disease International, 2016). Parkinsoni Tõve Sihtasutuse hinnangul on parkinsonism diagnoositud üle 10 miljonil inimesel üle terve maailma (Parkinson's Disease Foundation, 2017). Hetkel puudub igasugune haigust aeglustav või pidurdav ravim nende haiguste vastu, samuti on ebaselged Parkinsoni ja Alzheimeri tõve tekkepõhjused ja -mehhanismid. Neurodegeneratiivsete haiguste jaoks ravimite välja töötamine toimub intensiivselt üle maailma. Üks potentsiaalne suund on kasutada organismi enda närvikasvufaktoreid.

Kasvav teadustulemuste hulk viitab, et tserebraalne dopamiini närvikasvufaktor (CDNF) ja mesentsefaalne astrotsüütidest pärinev närvikasvufaktor (MANF) kaitsevad ja osaliselt regenereerivad loomudelites keskaju dopamiini närvirakke ja nende aksoneid (Airavaara et al., 2012; Bäck et al., 2013; Lindholm et al., 2007; Voutilainen et al., 2009). Parkinsoni tõve puhul degeneratsioon ja surevad just need samad, keskajus paiknevad mustained dopamiini tootvad närvirakud (Lees, Hardy ja Revesz, 2009). Samas on siiani selgusetuks jäänud mehhanismid, mille kaudu CDNF ja MANF närvirakke kaitsevad ja regenereerivad.

Ühe hüpoteesi kohaselt võib Parkinsoni ja Alzheimeri tõve algpõhjus peituda endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stressis, mille tekitab mittevoltunud valkude akumulatsioon ER-i luumenisse (Hetz ja Mollereau, 2014; Garcia-Huerta et al., 2016). Rakulise vastusena aktiveerub mittevoltunud valkude vastuse (*unfolded protein response*, UPR) rada (Rao ja Bredesen, 2004; Hoozemans et al., 2007; Hoozemans et al., 2012).

Uuringute tulemusena on selgunud, et erinevalt teistest tuntud närvikasvufaktoritest CDNF ja MANF lokaliseeruvad põhiliselt raku ER-is. Samuti on nende ekspressioonitasemed ja sekretsioon ER stressi poolt reguleeritud, mis on andnud alust loota, et äkki aitavad need närvikasvufaktorid lahendada rakkudes ER stressi ja seeläbi parandada närvirakkude elus püsimist (Apostolou et al., 2008; Glembotski et al., 2012; Mätlik et al., 2015; Mizobuchi et al., 2007). Üks potentsiaalne võimalus selleks on koostöö ER-is paiknevate šaperonidega, mille ülesandeks on teostada valkude kvaliteedikontrolli ja säilitada ER-i homöostaasi. Üheks selliseks levinud šaperoniks ER-is on immuunoglobuliin siduv valk (BiP), tuntud ka kui 78kDa glükoosi poolt reguleeritud valk (GRP-78).

Töö eesmärgiks on uurida närvikasvufaktori MANF-i valk-valk interaktsioone ER-i šaperoni BiP-iga ning ADP, ATP, hüdrolyüsitud ATP (AMP-PNP kujul) ja  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega. MANF-i

interaktsioonide parem mõistmine on oluline mõistmaks mehhanisme, mille kaudu MANF närvirakke kaitseb ja regenereerib.

Töö teostati Soomes, Helsingi Ülikooli Biotehnoloogia Instituudis.

## 1. Kirjanduse ülevaade

### 1.1. Närvikasvufaktorid

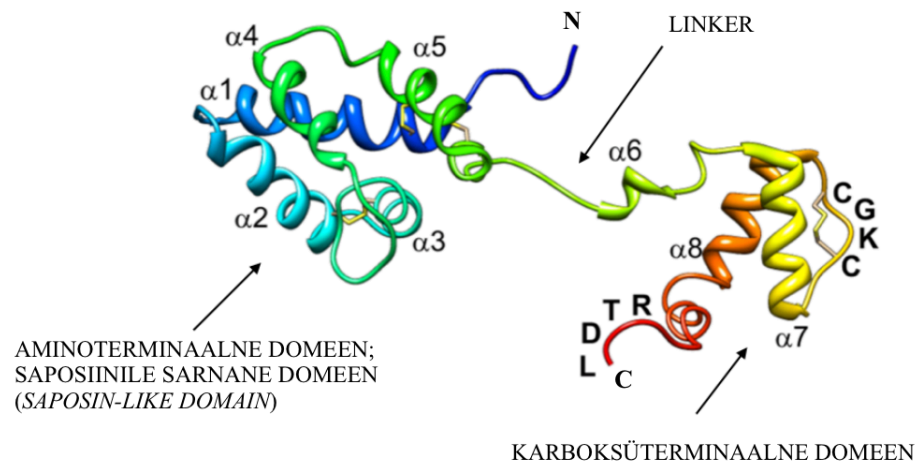
Kasvufaktoriteks nimetatakse sekreteeritud valke, mis seonduvad rakkude pinnaretseptoritega ja aktiveerivad need, misjärel raku signalisatsioonikaskaad raku sees viib raku kas jagunema, differentseeruma, migreeruma, morfoloogilistele muutustele või indutseerib apoptoosi. Tänapäevaks on kirjeldatud sadakond kasvufaktorit, mis mõjutavad närvirakke, kuid närvikasvufaktoriteks klassifitseeritakse ainult need, mille põhifunktsiooniks on reguleerida närvirakkude füsioloogiat ja arengut ning eelkõige stimuleerida neuronite eluspüsimist. Teisisõnu, närvikasvufaktorid on kasvufaktorid, mis reguleerivad närvirakkude eluspüsimist ja selle kaudu nende arvukust. Närvikasvufaktorid stimuleerivad aksonite kasvu, hargnevust, sünaptogeneesi, sünapsite plastilisust, fenotüüpi ning kaitsevad neuroneid vigastuste ja mürkide eest. Närvikasvufaktorite hulka kuuluvad näiteks neurotrofiinid, neurokiinid ja gliia närvikasvufaktorite perekond (Saarma, 2009).

#### 1.1.1. Mesentsefaalne astrotsüütide närvikasvufaktor

Mesentsefaalne astrotsüütide närvikasvufaktor (MANF) avastati 2003. aastal roti mesentsefaalsete astrotsüütide rakukultuuri söötmetest pärineva faktorina, mis toetas keskaju embrüonaalsete dopamiini närvirakkude ellujäämist *in vitro*. Inimese MANF on 20,7kDa, 179 aminohappe pikkune valk. MANF-i aminoterminaalses (N-terminaalses) domeenis paikneb 21 aminohappe pikkune signaaljärjestus, mille ensümaatilise lõikamise teel saadakse 18kDa suurune MANF. MANF-is on 8 konserveerunud tsüsteiinijääki, mis moodustavad 4 disulfiidsilda. MANF on evolutsiooniliselt konserveerunud valk nii selgroogsetes kui ka selgrootutes organismides (Petrova et al., 2003).

MANF koosneb kahest domeenist, mida ühendab linkerjärjestus, mis tõenäoliselt on vajalik kahe domeeni vabaks liikumiseks üksteise suhtes (Parkash et al., 2009; Hoseki et al., 2010). MANF-i N-terminaalne domeen koosneb viiest alfa-heeliksist ning on struktuuri poolest homoloogne saposiini sarnastele valkudele (*saposin-like proteins*, SAPLIPs) (Parkash et al., 2009). SAPLIP-id on funktsionaalselt mitmekesised valgud, kuid neile on iseloomulik võime interakteeruda nii lipiidide kui ka membraanidega (Bruhn, 2005). Samas, hetkel puudub publitseeritud informatsioon MANF-i ja lipiidide vahelistest interaktsioonidest. Karboksüterminaalne (C-terminaalne) domeen koosneb kolmest alfa-heeliksist, kus seitsmes ja kaheksas alfa-heeliks moodustavad heeliks-ling-heeliks motiivi (Hellman et al., 2011). Lisaks on leitud, et seitsmenda ja kaheksanda alfa-heeliksi vahel paikneb CXXC-motiivile sarnane aminohapete järjestus, inimese puhul on see CKGC. Inimese MANF-i CXXC motiivi

muteerimisel kaotab MANF nÄrvirakke kaitsva omaduse nii rakukultuuris kui ka aju isheemia roti loomudelis (MÄtlik et al., 2015) (Joonis 1).



**Joonis 1. Inimese MANF-i struktuur.** Joonisel on toodud välja alfa-heeliksid ( $\alpha$ ), CKGC motiivis paiknev disulfiidsild ning ER-i signaaljärjestus RTDL. Tuumamagnetresonants spektroskoopia (Muudetud joonis Lindström et al., 2013).

MANF-i C-terminaalse domeeni lähim struktuurne homoloog on Ku70 C-terminaalne SAP domeen (Hellman et al., 2011). Ku70, tuntud ka kui XRCC6, on muuhulgas ka tsütoplasmaatilise pro-apoptootilise Bcl-2-assotsieeritud X valgu (Bax) inhibiitor. Ku70 interakteerumine Bax-iga toimub läbi SAP domeeni, takistades Bax-i aktiveerumist ja seeläbi takistades raku apoptoosi (Sawada et al., 2003). Kui MANF-i või tema C-terminaalset domeeni süstiti kas komplementaarse DNA (cDNA) tuuma või valguna tsütoplasmasse, kaitsesid need hiire ülemise kaelaganglioni sümpaatiliste nÄrvirakkude Bax-vahendatud apoptoosi eest. Arvati, et MANF kaitseb rakke apoptoosi eest Bax-iga interakteerudes (Hellman et al., 2011). Siiski MANF-i ja Bax-i vahelist interaktsiooni pole siiani kirjeldatud ning MANF-i anti-apoptootiline aktiivsus pole tõenäoliselt Bax interaktsiooniga otseselt seotud (MÄtlik et al., 2015).

MANF on rakkude normaalse elutegevuse juures peamiselt lokaliseerunud ER-i luumenisse (Mizobuchi et al., 2007; Apostolou et al., 2008; Glembotski et al., 2012). ER-is paiknemisele vihjab ka MANF-i C-terminaalse domeeni otsas paiknev signaaljärjestus Arg-Thr-Asp-Leu (RTDL), mis sarnaneb ER-is lokaliseeruvate valkude konserveerunud signaaljärjestusega Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) (Joonis 1). KDEL ja RTDL on ER-i hoidmissignaalid (*ER-retention signals*), mis on vajalikud selleks, et seesuguseid signaaljärjestusi omavad valgud tuntuks Golgi kompleksis KDEL retseptorite (KDELRs) abil ära ja saadetakse transportvesiikulite vahendusel tagasi ER-i, hoides niiviisi ER-is funktsioneerivad valgud õiges organellis (Munro et al., 1987; Raykhel et al., 2007). RTDL järjestuse eemaldamisel sekreteerivad rakud MANF-i märksa

rohkem ning lokaliseerumine toimub ER-i asemel Golgi kompleksis (Oh-hashhi et al., 2012; Glembotski et al., 2012; Henderson et al., 2013; Mätlik et al., 2015).

Hetkel teadaolevalt reguleerib MANF-i sekretsiooni lisaks eelnevalt mainitud KDEL retseptoritele veel ka immuunoglobuliin siduv valk (BiP), mis on ER-is paiknev šaperon. Hiire kudedes on *Manf*-i ja *Bip*-i ekspressioon sarnane ning nende mõlema molekuli üle-ekspresseerimisel koguneb MANF rakku, isegi kui eemaldada MANF-i C-terminaalsest domeenist ER-i hoidmissignaali RTDL (Mizobuchi et al., 2007; Oh-hashhi et al., 2012).

Mitmed varasemad uuringud on andnud aluse arvata, et MANF on oluline ER-i homöostaasi tagamisel. MANF-i *knockdown* kultiveeritavates rakkudes aga ka MANF-i *knockout* hiirtes ja äädikakärbestes toob kaasa ER stressi, mis omakorda kutsub esile UPR-i (Apostolou et al., 2008; Lindahl et al., 2014; Palgi et al., 2012). Lisaks on MANF-i promootor-regioonis ER-i stressi vastuse element II järjestus (*ER stress response element II*, ERSEII). Seda järjestust tunnevad ära mitmed ER stressi poolt indutseeritud transkriptsioonifaktorid, täpsemalt ensümaatilise lõikamise läbi aktiveeritud transkriptsiooni aktiveeriv faktor 6 (*activating transcription factor 6*, ATF6) ja X-järjestusega seonduv valk 1 (*X-box binding protein 1*, XBP1) (Oh-Hashi et al., 2013). Eelnevaga on kooskõlas tulemused, mille kohaselt indutseerib ER-i stress MANF-i mRNA ja valgu sünteesi mitmes erinevas rakutüübis *in vivo* ja *in vitro* (Lee et al., 2003; Mizobuchi et al., 2007; Apostolou et al., 2008; Glembotski et al., 2012).

*Manf*-i mRNA ja MANF-i ekspressioon on detekteeritav vastsündinud ja täiskasvanud hiire mitmest erinevast aju regioonist, tugevamalt hipokampuses, ajukoores ja väikeaju Purkinje rakkudes (Lindholm et al., 2008). Lisaks on MANF laialt ekspresseeritud hiire perifeersetes kudedes. Kõige kõrgem ekspressioonitase on pankrease beeta- ja atsinaarrakkudes, süljenäärmetes ning testikulaarsetes spermatotsüütides, viidates, et MANF on oluline rakkudes, kus toimub kõrge valgusüntees ja –sekretsioon (Lindahl et al., 2014).

2014. aastal leiti üllatusena, et nii konventsionaalses *Manf*<sup>-/-</sup> *knockout* kui ka konditsionaalses pankrease spetsiifilises *Pdx-1 Cre::Manf*<sup>fl/fl</sup> *knockout* hiires tekkis tõsine insuliinsõltuv diabeet, mis oli tingitud sünnijärgselt pankrease beetarakkude proliferatsiooni vähenemisest ja suurenenud apoptoosist, teisisõnu progressiivsest beetarakkude vähenemisest. Selle lisaks täheldati samas töös, et pankrease saarekestes olid aktiveeritud UPR-iga seotud geenid ning tõusnud translatsiooni initsiatsiooni faktor 2 alfa (eIF2 $\alpha$ ) fosforülatsioon. Sellest tulenevalt on võimalik oletada, et pankrease beetarakkude suurenenud apoptoosi põhjus seisneb kroonilises ER stressis. Eelnevalt kirjeldatud hüpoteesiga on heas kooskõlas samas artiklis avaldatud tulemused, mis näitavad MANF-i võimet tõsta hiire beetarakkude proliferatsiooni *in vitro* ning diabeedi hiiremudelil parandada beetarakkude regeneratsiooni (Lindahl et al., 2014).

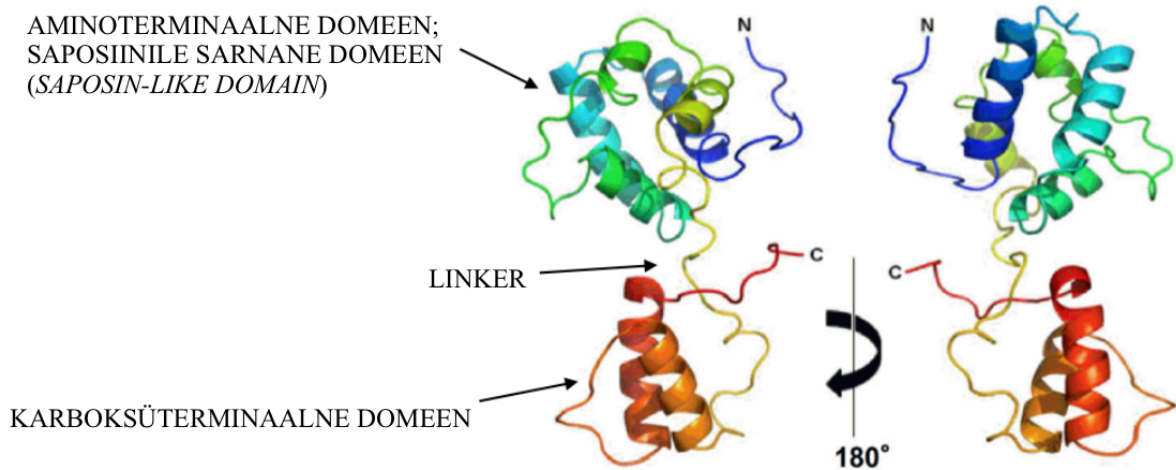
Täna on kirjeldatud MANF-i kaltsium-sõltuv interaktsioon BiP-iga. On püstitatud hüpotees, et rakkude tavaolekus moodustavad MANF ja BiP kompleksi, mille lagunemine on seotud kaltsiumi väljavooluga ER-st ning selle tulemusena tõuseb märgatavalt MANF-i sekretsioon (Glembotski et al., 2012). Samas tuleb rõhutada, et puuduvad andmed selle kohta, kas MANF-i interaktsioon BiP-iga on otsene või toimub kaudselt läbi ühise valkude kompleksi. Lisaks on leitud, et MANF interakteerub mutantse matriliin-3-ga (Hartley et al., 2013). Matriliin-3 on rakuväline valk, mida leidub kondrotsüütide ekstratsellulaarsest maatriksist. Matriliin-3-e täpne funktsioon on teadmata, kuid arvatakse, et see on oluline kollageeni ja teiste kõhres leiduvate valkude õiges paigutumises (Klatt et al., 2000).

Kõik eelnevalt välja toodud tulemused viitavad sellele, et MANF-il on äärmiselt lai ja tugev mõju mitte ainult keskaju dopamiini närvirakkudele vaid ka teistele rakutüüpidele. Samas on jäänud siiani ebaselgeks MANF-i molekulaarsed töömehhanismid ning võimalikud interaktsioonid teiste molekulidega.

### **1.1.2. Tserebraalne dopamiini närvikasvufaktor**

Tserebraalne dopamiini närvikasvufaktor (CDNF) avastati 2007. aastal professor Mart Saarma uurimisrühma poolt. Tegemist on 20,9kDa, 187 aminohappe pikkuse valguga. Sarnaselt MANF-ile, paikneb ka CDNF-i N-terminaalses domeenis signaaljärjestus, mis CDNF-i puhul on 26 aminohappe pikkune. Signaaljärjestus lõigatakse ER-is CDNF-ilt, mille tulemusena saadakse 161 aminohappeline valk. CDNF-l on 8 konserveerunud tsüsteiinijääki, mis moodustavad 4 disulfiidsilda (Lindholm et al., 2007).

Analüüsides CDNF-i struktuuri röntgenkristallograafia ja tuumamagnetresonants spektroskoopia (NMR) abil, on leitud, et sarnaselt MANF-le on ka CDNF-i N-terminaalne domeen homoloogne saposiini sarnastele valkudele (*saposin-like proteins*, SAPLIPs) (Latgé et al., 2013; Parkash et al., 2009). Nii nagu MANF-i puhul, puudub ka CDNF-i jaoks igasugune publitseeritud informatsioon interaktsioonidest lipiididega. Lisaks eelnevalt välja toodud sarnasustele MANF-iga, leidub ka CDNF-is N-terminaalset ja C-terminaalset domeeni ühendav painduv linker (Joonis 2) (Hoseki et al., 2010; Latgé et al., 2015).



**Joonis 2. Inimese CDNF-i struktuur lahuses.** Joonisel on lisaks linkerile visualiseeritud N- ja C-terminuses paiknevad, vastavalt viis ja kaks alfa-heeliksit. Tuumamagnetresonants spektroskoopia (Muudetud joonis Latgé et al., 2015).

NMR spektroskoopia analüüsi järgi on CDNF-i ja MANF-i C-terminaalsed domeenid struktuurselt sarnased, omades vastavalt kahte ja kolme alfa-heeliksit (Hellman et al., 2011; Latgé et al., 2015). Inimese CDNF-i C-terminaalse domeeni otsas paikneb signaaljärjestus Lys-Thr-Glu-Leu (KTEL), mis on sarnane konserveerunud ER-i hoidmissignaaliga KDEL ja see justkui viitab CDNF-i lokaliseerumisele ER-is (Raykhel et al., 2007). Eelnevaga on kooskõlas katsetulemused, mis näitavad, et kui rakkudes *in vitro* üle-ekspressseerida BiP või KDEL retseptor 1, siis CDNF-i sekretsioon väheneb (Norisada et al., 2016). Sarnane muutus toimus ka MANF-i sekretsioonis ning oletatavasti võivad CDNF-i ja MANF-i sekretsioonimehhanismid olla samalaadsed.

*In situ* hübridisatsiooni tulemuste põhjal on *Cdnf*-i mRNA ekspressioon madalal tasemel detekteeritav peaaegu kõigist regioonidest embrüonaalse, vastsündinud ja täiskasvanud hiire ajus (Lindholm et al., 2007). Pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (*reverse transcription PCR*, RT-PCR) analüüsi abil on *Cdnf*-i mRNA detekteeritav ka täiskasvanud inimese ajust, seda kõigis regioonides. Kudede immuunvärvimise (*immunohistochemistry*, IHC) tulemused viitavad, et CDNF-i valgusüntees täiskasvanud hiire ajus toimub peamiselt närvirakkudes. Lisaks ajule on nii inimese kui ka hiire *Cdnf*-i mRNA ja valk detekteeritav perifeersetest kudedest. CDNF on eriti kõrgelt ekspresseeritud täiskasvanud hiire skeetilihastes, südames ja testistes (Lindholm et al., 2007). Võrreldes CDNF-i ja eelmises alapeatükis käsitletud MANF-i ekspressiooni, on märgatavad teatavad sarnasused ja erinevused. Kui MANF-i ja CDNF-i ekspressioon on mõlema puhul detekteeritav ajus, CDNF-i puhul küll nõrgemalt, siis perifeersetes kudedes on nende kahe närvikasvufaktori ekspressiooni tase küllatki erinev – võrreldes ülejäänud kudedega, on MANF-i süntees väga



aktiivne endo- ja eksokriinsetes kudedes, CDNF-i puhul on nendeks kudedeks eelnevalt loetletud süda, skeletilihased ja testised.

Erinevalt konventsionaalsest  $Manf^{-/-}$  *knockout* hiiremudelist, pole konventsionaalses  $Cdnf^{-/-}$  *knockout* hiires sündides silmnähtavalt mingeid defekte. Arengu jooksul osa seedekulglane näärvirakkudest sureb ja hiirtel tekib kõhukinnisus sarnaselt Parkinsoni tõve haigetega. Hiirte keskaju dopamiini näärvirakud ei sure, kuid neis tekib tõsine funktsionaalne häire (Lindahl, Chalazonitis, Saarma et al., käsikiri on valmimisel).

Tulenevalt MANF-i ja CDNF-i struktuurset ja primaarjärjestuse sarnasusest ning tähelepanekust, et MANF vähendab dopamiini näärvirakkude suremust *in vivo*, on uuritud ka CDNF-i mõju dopamiini näärvirakkudele (Voutilainen et al., 2009). Esimesed avaldatud tulemused pärinevad 2007. aastast, kui CDNF-i mõju dopamiini näärvirakkudele hinnati roti Parkinsoni tõve loomudelil, kus dopamiini näärvirakkude käängumise esilekutsumiseks kasutati neurotoksiini 6-hüdroksüdopamiin (6-OHDA). CDNF manustati rottidele 6 tundi peale 6-OHDA süstimist ning see oli doosist sõltuvalt dopamiini näärvirakke kaitsev. On tähelepanuväärne, et CDNF-i dopamiini näärvirakke kaitsev mõju oli samas loomudelis täheldatav isegi 1 kuu peale 6-OHDA süstimist (Lindholm et al., 2007). Samuti oli CDNF dopamiini näärvirakke kaitsev ja regeneratiivne hiire Parkinsoni tõve loomudelil, kus neurotoksiinina kasutati 1-metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetra hüdropüridiini (MPTP) (Airavaara et al., 2012).

Dopamiini näärvirakkude kaitvale ja regenereerivale võimele lisaks on CDNF-il kaks väga olulist omadust, mille tõttu nähakse selles näärvikasvufaktoris olulist potentsiaali Parkinsoni tõve ravis. Esimene neist on CDNF-i difusioon ajus, mis on märgatavalt parem võrreldes kahe uuritud ja kliinilistes katsetustes osalenud näärvikasvufaktoritega - gliia näärvikasvufaktor (GDNF) ja neurturiin (NRTN) (Voutilainen et al., 2011; Lin et al., 1993; Kotzbauer et al., 1996; Hamilton et al., 2001). Teine oluline CDNF-i omadus väljendub selles, et CDNF ei mõjuta loomudelites dopamiini näärvirakke, mida pole mõjutatud neurotoksiinidega (Voutilainen et al., 2011, Airavaara et al., 2012). Seevastu GDNF võib indutseerida tervetes loomades dopamiini näärvirakkude aksonite harunemist ning dopamiini omastamist, mis võib põhjustada soovimatuid kõrvalmõjusid (Lin et al., 1993; Love et al., 2005; Kopra et al., 2017). Erinevalt muudest näärvikasvufaktoritest suudab CDNF inhibeerida Parkinsoni tõve loomudelites UPR-i (Voutilainen et al., 2017).

## 1.2. Endoplasmaatiline retiikulum

Endoplasmaatiline retiikulum (ER) on ühekordse membraaniga rakuorganell, mille membraan moodustab üle poole eukarüootse raku kogumembraanistikust. ER-i membraanistik on pidev, moodustab erinevate funktsioonidega üksusi ning kontakteerub teiste organellidega, näiteks mitokondritega, osaledes isegi nende jagunemisel (Terasaki ja Jaffe, 1991; Terasaki et al., 1994; Friedman et al., 2011). ER-i valendikku nimetatakse luumeniks ning see moodustab ligikaudu 10% kogu raku mahust. ER-il on keskne roll nii lipiidide kui ka valkude biosünteesis, lisaks on see rakusisene  $\text{Ca}^{2+}$  ionide salv ning omab olulist tähtsust mitmete raku signalisatsiooniradade aktiivsuse regulatsioonis. Kõik sekreteeritavad ja transmembraansed valgud ja samuti erinevates rakuorganellides vajaminevad transmembraansed valgud ja lipiidid, näiteks kolesterool, sünteesitakse ER-i membraanis paiknevate ensüümide abil. ER-st transporditakse need edasi Golgi kompleksi, kust omakorda saadetakse need õigetes sihtpunktidesse. Teisisõnu – ER-l on keskne roll väga erinevates biosünteesiprotsessides (Alberts et al., 2014). On huvitav ning tähelepanu väärt, et ATP ja  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonid ER-is on pöördvõrdelises seoses. Kui ER-st toimub  $\text{Ca}^{2+}$  ionide väljavool, siis ATP kontsentratsioon suureneb (Vishnu et al., 2014). ER-i luumenis on  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioon  $\sim 1\text{mM}$ , millest vaba  $\text{Ca}^{2+}$  on hinnanguliselt  $200\mu\text{M}$  (Robert et al., 1998).  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni puhverdavad mitmed ER-is paiknevad valgud, ligi 50% osakaaluga teeb seda kalretikuliin, BiP-i osakaaluks on hinnatud 25% (Prins ja Michalak, 2011). ATP kontsentratsiooni ER-is pole siiani suudetud täpselt mõõta, kuid arvatakse, et see on sarnane tsütosoolse ATP kontsentratsiooniga. Tsütosoolse ATP kontsentratsioon varieerub sõltuvalt organismist ja rakutüübist, kuid on hinnanguliselt  $1\text{--}10\text{mM}$  (Beis ja Newsholm, 1975; Imamura et al., 2009).

Imetajarakkudes algab suure enamuse sekretoorsete või membraansete polüpeptiidide transport ER-i luumenisse juba nende sünteesimise alguses, seda nimetatakse kotranslatsiooniliseks transpordiks. Sellisel juhul on ribosoomid sünteesitava polüpeptiidi vahendusel kinnitunud ER-i membraanile, N-terminaalne polüpeptiidi osa on läbi ER-i membraanis paikneva poori sisenenud luumenisse, samal ajal kui C-terminaalset osa alles sünteesitakse (Crowley et al., 1994). Klassikalises histoloogias nimetatakse sellist ER-i, millele on ribosoomid kinnitunud, karedapinnaliseks ER-ks (Alberts et al., 2014).

Polüpeptiidid sisenevad ER-i õiget konformatsiooni omamata. Siit tuleneb ER-i väga tähtis roll, milleks on polüpeptiidide modifitseerimine, mis kujutab endast nii polüpeptiidide õigesse konformatsiooni viimist, erinevate suhkrujääkide lisamist ehk glükosüleerimist kui ka proteolüütilist lõikamist. Kõiki loetletuid nimetatakse koondavalt post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks. Tulenevalt sellest peab ER-i luumen omama nendeks modifikatsioonideks õiget ja soodustavat keskkonda. Vale konformatsiooniga polüpeptiidid,

mida ei õnnestu korrigeerida, saadetakse ER-ist tsütosooli ja lagundatakse proteasoomides (*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*, ERAD) (Lippincott-Schwartz et al., 1988; McCracken ja Brodsky, 1996). Kui vale konformatsiooniga polüpeptiidide hulk kasvab üle kriitilise taseme ning ER-i luumeni homeoostaas saab rikutud, toob see endaga kaasa keerulise signalisatsioonisüsteemi aktiveerumise, UPR-i, mida käsitletakse detailsemalt järgmises alapunktis (Walter ja Ron, 2011).

ER-i olulisust rakus ilmestavad kõige paremini olukorrad, kus ER-i korrektne toimimine on häiritud ning sellest tingitud rasked tagajärjed.

Autosomaalne dominantne polütsüstiline maksahaigus on haruldane pärilik haigus, mida iseloomustab järkjärguline tsüstide teke sapiteede epiteelile. Haiguse sümptomid ilmnevad reeglina vahemikus 40-60-aastaselt. Uurimistulemused viitavad, et polütsüstilise maksahaigusega on seotud Sec63 geeni muteerumine, mis muudab selle mittefunktsionaalseks (Davila et al., 2004; Fedeles et al., 2011). Sec63 on ER-i transmembraanne valk, mille üheks oluliseks funktsiooniks on aidata vahendada mitmete sekretoorsete ning plasmamembraansete valkude transporti ER-i. Mitmed Sec63 abil transporditavad valgud on seotud rakkude kasvu reguleerimise ja polaarsusega. Seega kui Sec63 on mittefunktsionaalne, ei jõua vajalikud valgud õigesse sihtpunkti ning rakkude adhesioon ning kasv on tavapärasest erinevad (Lang et al., 2012).

ER-i homöostaasi olulisust illustreerivad kõnekalt ka Akita hiired. Akita hiirtel on mutatsioon insuliin 2 (Ins2) geenis, mille tõttu on takistatud insuliinis ühe molekulisese disulfiidsilla moodustumine ning tulemuseks on vale konformatsiooniga ning mittefunktsionaalne insuliin (Yoshioka, et al. 1997). Mitteproduktiivne voltimine ER-is toob kaasa vale konformatsiooniga insuliinimolekulide kogunemise ER-i, see tekitab ER-i stressi, mis omakorda aktiveerib UPR. Krooniline UPR suunab beetarakud apoptoosi, mille tagajärjel tekib hiirel insuliinsõltuv diabeet (Oyadomari et al., 2002; Izumi et al., 2003).

ER-is aitavad polüpeptiidide õiget konformatsiooni saavutada mitmed erinevad šaperonid, ko-šaperonid ning mitmed muud abivalgud. Väga levinud šaperon ER-is on BiP, mille detailsem käsitlemine on eraldi alapeatükis. Lisaks on ER-is mitmed muud šaperonid nagu 94kDa glükoosi poolt reguleeritud valk (*94kDa glucose-regulated protein*, GRP-94), kalneksiin ja kalretikuliin (Lewis, Mazzearella ja Green, 1985; Degen ja Williams, 1991; Peterson et al., 1995).

GRP-94 on konstitutiivselt ekspresseeritud peaaegu kõigis rakutüüpides ning selle transkriptsioon on reguleeritud koordineeritult BiP-iga (Liu ja Lee, 1991). GRP-94 mängib väga olulist rolli kaasasündinud ning omandatud immuunvastuse tekkimisel, interakteerudes ER-is eelistatult rakupinnaretseptorite, -ligandide ja sekretoorsetes radades paiknevate

ensüümide eellas-polüpeptiididega. Eelnimetatute hulka kuuluvad näiteks Tolli-sarnased retseptorid 1, 2 ja 4, põhiline koosobivuskompleks II aga ka immuunoglobuliinide kerged ja rasked ahelad (Randow ja Seed, 2001; Schaiff et al., 1992; Melnick et al., 1992).

Kalnexiin on ER-i transmembraanne valk, mille N-terminaalne, šaperoni-aktiivsusega domeen on suunatud luumeni poole. Kalnexiini roll on eelkõige seonduda mittevolditud glükoproteiinidega ning viia need õigesse konformatsiooni (Leach et al., 2002).

Kalretikuliin on kalnexiini paraloog, mis paikneb ER-i luumenis (Fliegel et al., 1989). Nii nagu kalnexiini puhul, on ka kalretikuliini funktsioon ER-is viia glükoproteiinid õigesse konformatsiooni (Leach et al., 2002).

### 1.2.1. Mittevoltunud valkude vastus

Mittevoltunud valkude vastuseks (UPR) nimetatakse raku signalisatsioonisüsteemi, mis detekteerib vales konformatsioonis ja/või mittevoltunud valke endoplasmaatilises retiikulumis ja käivitab mitmed erinevad rakulised mehhanismid, et taastada homöostaas. Üheks selliseks mehhanismiks on käivitada järgmisi valke kodeerivate geenide transkriptsioon: tsütosoolis valkude degradatsioonis osalevad, retrotranslokatsioonis osalevad, ER-i šaperonid aga ka mitmed muud valgud, mis aitavad tõsta valkude voltimise võimekust ER-is (Alberts et al., 2014).

UPR signalisatsioonisüsteemis töötab paralleelselt kolm signalisatsioonirada:

Esimene neist on seotud ER-i transmembraanse inositol-1-fosfatase (IRE1), mis pärast vastava signaali saamist oligomeriseerub ja fosforüleerib iseennast. See viib edasi IRE1 tsütosoolse endoribonukleaase domeeni aktiveerumisele (Li et al., 2010). Aktiveeritud endoribonukleas lõikab tsütosoolis Xbp1 kodeerivalt mRNA-lt introni, mille tulemusel transleeritakse lõigatud mRNA-lt aktiivne transkriptsiooni reguleeriv valk Xbp1 (Yoshida et al., 2001; Calton et al., 2002). Xbp1 abil aktiveeritakse järgmiste geenide transkriptsioon, mis vahendavad UPR-i (Travers et al., 2000). IRE1 lagundab ka mRNA-sid ning vähendab niimoodi valgusünteesi (Hollien et al., 2009).

Teine signalisatsioonirada on seotud ER-i transmembraanse kinaasiga PKR-le sarnanev endoplasmaatilise retiikulumi kinaas (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK), mis pärast aktivatsiooni inhibeerib translatsiooni, fosforüleerides translatsiooni initsiatsioonifaktori eIF2  $\alpha$ -subühikut ja seeläbi vähendab rakus valkude tootmist ning seega ka uute töötlemist vajavate valkude sissevoolu ER-i (Harding et al., 1999). Võrreldes teiste UPR signaalradadega toimub aktivatsioon kõige kiiremini läbi PERK-i. Juba 30 minutit pärast ER stressi tekkimist on kogu eIF2-st sõltuv translatsioon inhibeeritud (Novoa et al., 2003). Sellisel inhibeerimise mehhanismil on ka teine pool – mõnede valkude translatsiooni aktiivsus tõuseb kui eIF2 on

fosforüleeritud. Üheks selliseks valguks on transkriptsiooni aktiveeriv faktor 4 (*activating transcription factor 4*, ATF4), mis tõstab teiste UPR-i vahendavate geenide transkriptsiooni (Harding et al., 2000; Alberts et al., 2014).

Kolmas signalisatsioonirada on seotud transkriptsiooni aktiveeriva faktoriga 6 (*activating transcription factor 6*, ATF6), mis algselt sünteesitakse ER-i transmembraanse valguna. Kuna ATF6 on seotud ER-i membraaniga, ei saa see aktiveerida geenide transkriptsiooni tuumas. Kui mittevoltunud valgud akumuleeruvad ER-i luumenisse, siis ATF6 transporditakse Golgi kompleksi, kus ensümaatiliseltselt lõigatakse tsütosoolne domeen proteaaside poolt ja aktiivne tsütosoolne domeen saab liikuda tuuma ning aktiveerida mitmete geenide transkriptsiooni, millelt transleeritud valgud vahendavad UPR-i (Haze et al., 1999; Li et al., 2000; Chen et al., 2002).

### 1.2.2. Immuunoglobuliine siduv valk

1977. aastal avastati kana embrüo fibroblasti rakkudest, et umbes 70kDa valgu süntees on reguleeritud glükoosi poolt ning uus valk nimetati 78kDa glükoosi poolt reguleeritud valguks (GRP-78) (Pouyssegur et al., 1977). 1983. aastal leiti, et pre-B-lümfotsüütides seob tundmatu valk immuunoglobuliini rasket ahelat (IgH) ning selle valgule anti nimi immuunoglobuliine siduv valk (BiP) (Haas et al., 1983). Alles hiljem mõisteti, et tegmist on sama valguga, millel on märksa laialdasemad funktsioonid rakus, täpsemalt ER-is (Munro et al., 1986).

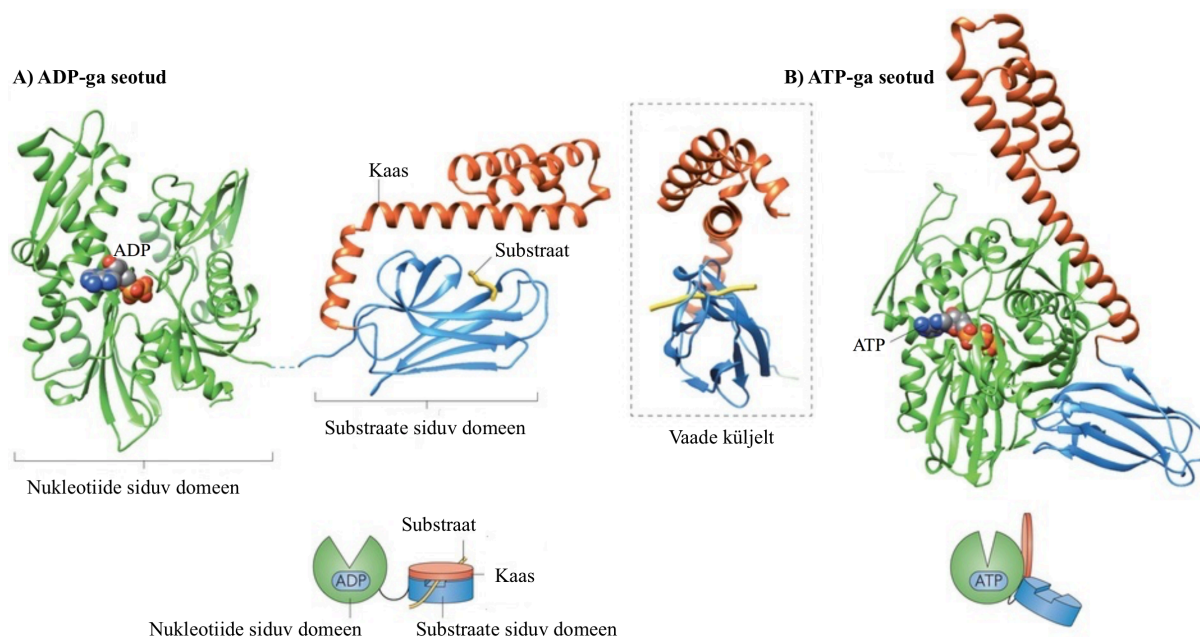
BiP-i kontsentratsioon ER-is on väga kõrge, näiteks koera pankreases lausa 5µM (Weitzmann et al., 2007).

BiP koosneb kahest suurest domeenist – N-terminaalsest ATP-aasse aktiivsusega nukleotiide siduvast ning C-terminaalsest substraati siduvast domeenist. Substraati siduva domeeni koosseisu kuulub ka alfa-helikaasne “kaas”, mis sulgeb substraati siduva tasku (Flaherty et al., 1990; Zhu et al., 1996; Morshauser et al., 1999).

BiP-i afiinsus substraatide suhtes on otseselt seotud tema ATP-aasse domeeni tsükliga – ATP sidumine, misjärel toimub ATP hüdroolüüs ning lõpetuseks ADP eemaldamine ning uue ATP sidumine. Kõike seda aitavad läbi viia mitmed erinevad kofaktorid. Nende hulka kuuluvad seitse ER-is lokaliseeruvat Dna-J-le sarnast valku (*ER-localized Dna-J-like proteins*, ERdjs), millest ERdj3 ja ERdj4 interakteeruvad ise substraatmolekulidega ning vahendavad need BiP-ile, samaaegselt stimuleerides BiP-i ATP-aasset aktiivsust (Hendrick et al., 1993; Mayer et al., 1999; Jin et al., 2008; Lai et al., 2012). BiP-i ATP-aasse aktiivsuse jaoks on vajalik  $Mg^{2+}$  ioonide olemasolu, samas  $Ca^{2+}$  on inhibeeriva toimega (Kassenbrock ja Kelly, 1989).

Joonisel 3 on toodud BiP-le väga sarnase šaperoni, kuumavalgu 70 (*heat shock protein 70*, Hsp70), kolmedimensionaalne struktuur. Nende mõlema šaperoni töömehhanism on praktiliselt

identne: ATP sidumisel on substraati siduva tasku “kaas” lahti ning afiinsus substraadmolekulide vastu on madal. Seevastu ADP-ga seondunud šaperoni “kaas” on sulgunud ja afiinsus substraadi vastu kõrge (Flynn et al., 1989; Schmid et al., 1994). Teisisõnu, ATP hüdrolüüsil fikseeritakse substraat tugevalt substraati siduva domeeni vaku. Nukleotiidivahetusfaktorid katalüüsivad ADP vahetamise ATP vastu ning see toob endaga kaasa substraadi vabastamise šaperonilt ning uus tsükkel saab algusest alata (Theysen et al., 1996; Packschies et al., 1997; Minami et al., 1996).



**Joonis 3. Täispika Hsp70 struktuur.** Joonisel on näidatud šaperoni Hsp70 konformatsiooni sõltuvus nukleotiidi siduva domeeni ATP-aasest tsüklist. A) ADP-ga seotud šaperoni kaas on sulgunud ning substraat on suletud substraati siduva domeeni ja kaane vahele. B) ATP-ga seotud šaperoni kaas on avatud ning mõlemad šaperoni domeenid on üksteisele lähemal. Allpool on konformatsiooni muutused kujutatud skemaatiliselt (Muudetud joonis Saibil, 2013).

BiP seondub ER-is lühiajaliselt äsjasünteesitud polüpeptiididega, kuid märksa pikaajalisemalt polüpeptiididega, millel on vale konformatsioon, mis on mittetäielikult glükosüleeritud või mittekorrektelt kokku pandud ning sellest tulenevalt on nende edasine transport ER-st blokeeritud. Sedaviisi takistab BiP nende molekulidesisest ja –vahelist agregeerumist ning samuti säilitab selliste edasist töötlust vajavate polüpeptiidide õiget olekut järgmisteks voltimise reaktsioonideks (Gething, 1997).

BiP aitab vahendada vastsünteesitud polüpeptiidide transporti ER-i läbi poori, mille moodustab Sec61 (Hamman, Hendershot ja Johnson, 1998; Haigh ja Johnson, 2002; Alder et al., 2005).

BiP-il on keskne roll UPR signaalsüsteemiraja aktiveerimisel. Raku normaalse elutegevuse juures on ATF6 BiP-iga interakteerunud ja seeläbi on ATF6-e Golgi kompleksi lokaliseerimisignaali varjatud ning transport takistatud (Shen et al., 2002). Lisaks

interakteerub BiP nii IRE1 kui ka PERK-i luminaalse domeeniga (Carrara et al., 2015). BiP-i puudumisel osalevad IRE1 samad piirkonnad dimeriseerumisel, mis viib lõpuks UPR aktiveerumiseni (Liu, Xu ja Kaufman, 2003). Sellega on kooskõlas uurimistulemused, mis näitavad, et BiP-i *knockdown* rakkudes aktiveeritakse UPR isegi ER stressi puudumisel. Teisisõnu, tulemused viitavad, et BiP reguleerib UPR-i negatiivse tagasiside kaudu (Pyrko et al., 2007; Li et al., 2008).

BiP on asendamatu rolliga valk rakkude proliferatsioonil ning nende elus püsimisel. *Bip*<sup>-/-</sup> hiire embrüotel oli märgatav rakkude proliferatsiooni vähenemine, massiivne sisemise rakumassi rakkude apoptoos ning embrüod ei elanud kauem kui 3,5 päeva peale munaraku viljastamist (Luo et al., 2006).

Järjest enam teadustöid viitavad, et BiP võidakse huvitaval kombel relokaliseerida ER-ist nii rakkude pinnale, mitokondrisse, rakutuumas kui ka mõndadest spetsiifilistest rakkudest välja sekreteerida (Berger et al., 1997; Xiao et al., 1999; Shin et al., 2003; Philippova et al., 2008; Sun et al., 2006; Rao et al., 2002; Matsumoto ja Hanawalt, 2000; Barker et al., 2005; Tsunemi et al., 2010; Marín-Briggiler et al., 2010). Seetõttu võib öelda, et BiP on väga mitmekülgne ning mitmetes erinevates rakuprotsessides osalev valk.

BiP on võimeline raku apoptoosi alla suruma takistades pro-apoptootiliste valkude aktivatsiooni. Nende hulka kuuluvad BCL-2-ga interakteeruv tapja (*BCL-2-interacting killer*, BIK) ja kaspas-7 (Reddy et al., 2003; Fu, Li ja Lee, 2007; Zhou et al., 2011). Sellele lisaks on leitud, et BiP osaleb mitokondrite homöostaasis ning seeläbi aitab ära hoida mitokondrite väärtalitlust ja sellest tulenevat apoptoosi. BiP vähendab Ca<sup>2+</sup> ionide voolu ER-ist mitokondritesse aga ka Ca<sup>2+</sup> ionide omastamist mitokondrites, piirab vabade radikaalide tootmist ja aitab säilitada mitokondrite membraanipotentsiaali (Ouyang et al., 2011).

## **2. Eksperimentaalosa**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid olid:

1. Uurida ja iseloomustada MANF-i valk-valk interaktsioone BiP-iga.
2. Uurida ja iseloomustada MANF-i interaktsioone ADP, ATP, AMP-PNP ning  $\text{Ca}^{2+}$  ioonidega.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Töös kasutatud valgud**

BiP saadi koostööpartneri professor Richard Zimmermanni ja tema kaastöötajate käest (Saarlandi Ülikool, Homburg, Saksamaa). Käesolevas uurimistöös on kasutatud hamstri BiP-i, mis on toodetud *Escherichia colis*. Antud BiP-i N-terminaalses otsas on His<sub>6</sub> järjestus (Bies et al., 1999; Weitzmann et al., 2007).

Inimese MANF on toodetud Icosageni poolt hiina hamstri munasarjarakkudes (CHO rakud). BiP-i substraatpeptiid (BSP) on toodetud Pepscani poolt keemilise sünteesi teel. Kasutatud BSP on immuunoglobuliini raskest ahelast pärit hüdrofoobne järjestus, mis mimikeerib BiP-le tema substraati. Tegemist on lühikese, 7 aminohappelise peptiidiga, mille järjestus on HTFPAVL (Marcinowski, Höller et al., 2011; Marcinowski et al., 2013).

#### **2.2.2. BiP-i märkimine Alexa-647 fluorofooriga**

Antud uurimistöös käigus kasutatud BiP märgiti fluorofooriga Alexa-647 polühistidiini järjestuse (His-tag) kaudu. Valgu märkimine põhineb polühistidiini tugeval afiinsusel nikliga, antud juhul niklisooladega, kuid tegemist ei ole kovalentse sidemega.

BiP-i kontsentratsioon pärast märkimist oli ~200nM ja mõõtmistel kasutatav lõppkontsentratsioon ~20nM.

BiP-i märkimine viidi läbi tootjafirma NanoTemperi protokoll jälgides mõndade muudatustega, mis puudutasid märgitava valgu ja märgise kontsentratsiooni.

Nii 200nM kui ka 20nM kontsentratsioonid on liialt madalad, et neid täpselt mõõta spektrofotovo või kolorimeetriselt, mistõttu töös kasutatud lõppkontsentratsioonid on arvutuslikult tuletatud R. Zimmermanni uurimisgrupilt saadud alglahuse kontsentratsioonist.



### 2.2.3. MANF-i märkimine Alexa-647 fluorofooriga

MANF-il polühistidiini järjestus puudub ning seetõttu tuli kasutada primaarsete amiinidega reageerivat fluorofoori molekuli. Primaarsed amiinid leiduvad lüsiinide kõrvalahelates ning selle kaudu luuakse kovalentne esterside fluorofoori ja uuritava valgu vahel. BiP-i ja MANF-i märkimisel on üks suur ning oluline vahe – kui BiP-i molekuliga saab teoreetiliselt liituda maksimaalselt üks fluorofoor siis MANF-i puhul on see arv suurem. MANF-i märkimisel tuli reageerimata jäänud fluorofoor eemaldada valgulahusest ning selleks kasutati suurskromatograafiat, Thermo Scientific’u Zeba<sup>TM</sup> Spin nimelisi kolonne kasutades. Kuna märgitava MANF-i kontsentratsioon oli märksa kõrgem kui BiP-il, oli valgu kontsentratsiooni ning märkimise efektiivust võimalik mõõta spektrofotomeetriliselt, kasutades selleks Thermo Scientific’u NanoDrop’i nimelist spektrofotomeetrit. Mõõtmised viidi läbi kolmel sõltumatul pipeteerimisel 280nm ja 650nm lainepikkuste juures.

Valgu kontsentratsiooni ja märkimise efektiivsuse arvutamiseks kasutati Molecular Probes<sup>TM</sup> protokollis A30009 toodud valemeid.

Kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati valemit: 
$$\left[ c \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] = \frac{[A_{280} - 0,03(A_{650})]}{A_{280} \text{ kui valgu konts. on } 1 \text{ mg/ml}}$$

MANF-i neelduvuskoefitsendina  $A_{280}$  1mg/ml valgu kohta kasutasime ExPASy ProtParam internetikeskkonnast saadud tulemust 0,905 (Artimo et al., 2012).

Märkimise efektiivsuse arvutamiseks kasutati valemit:

$$E \left( \frac{\text{mol värv}}{\text{mol valg}} \right) = \frac{A_{650}}{239\,000 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1} \times \text{valgu kontsentratsioon (M)}}$$

### 2.2.4. Mikroskaalas termoforees

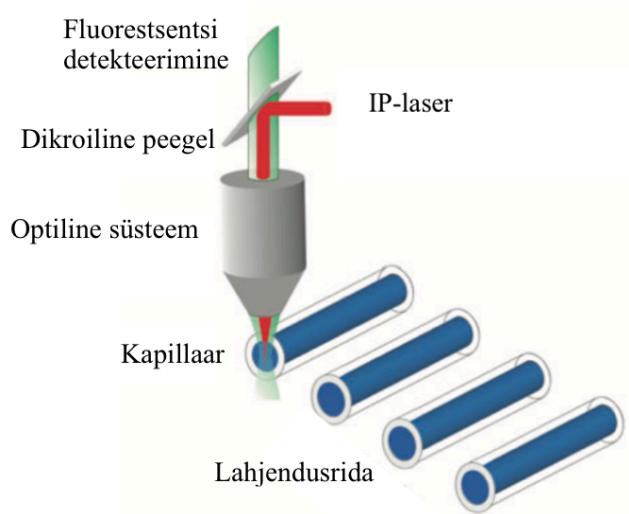
Mikroskaalas termoforees (*microscale thermophoresis*, MST) on (bio)molekulide vaheliste interaktsioonide analüüsimeetod, mille tööpõhimõte seisneb termoforeesis. Termoforees on füüsikaline nähtus, kus molekulid liiguvad suunatult temperatuuriväljas ning selline liikumine on väga tundlik muutustele molekuli suurusel, konformatsioonis, laengus ning hüdratsioonikihis. Molekulide vaheline interaktsioon muudab ühte või mitut eelmainitud parameetritest. Väga kõrge tundlikus muudab selle meetodi sobivaks erinevate molekulide interaktsioonide uurimiseks. Samuti on MST eelisteks väga väike proovi- (mõned mikrolitrid nanomolaarses kontsentratsioonis) ja ajakulu, analüüsitavad on igasuguse molekulmassi ja suurusega molekulid, alates metalliioonidest kuni suurte valkudeni ning mis kõige tähtsam, analüüsitavad molekulid on lahuses vabalt liikuvad. Lahusena võib kasutada näiteks nii puhverlahust, rakulüsaati kui ka vereseerumit (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).

Temperatuurigradient (bio)molekulide vesilahuses ei kutsu esile ainult soojusliikumist vaid ka (bio)molekulidevoo. Sellist soojus- ja massivoo seotust nimetatakse Ludwig-Soret efektiks või

termofooresiks. Esimesena kirjeldas sellist füüsikalist nähtust Carl Ludwig 1856. aastal. Termofooreetilise efekti mikroskaalas kirjeldavat teooriat tänaseni pole.

Mikroskaalas termofooresi jaoks kasutatav aparatuuri lühikokkuvõte:

Mikroskaalas termofooresi masin koosneb infrapunalaserist (IP-laser), mis on ühendatud samale teele fluorofoori ergastamiseks ja emissiooni registreerimiseks kasutatava dikrooinilise peegliga (Joonis 4). IP-laseri abil luuakse  $\sim 200\mu\text{m}$  läbimõõduga temperatuurigradient. MST viiakse läbi 10-16 lahjendusrea eri kontsentratsiooniga proove sisaldavates, 4-10  $\mu\text{l}$  mahutavates klaaskapillaarides, mis on omakorda asetatud kandjale (Joonis 5) (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).



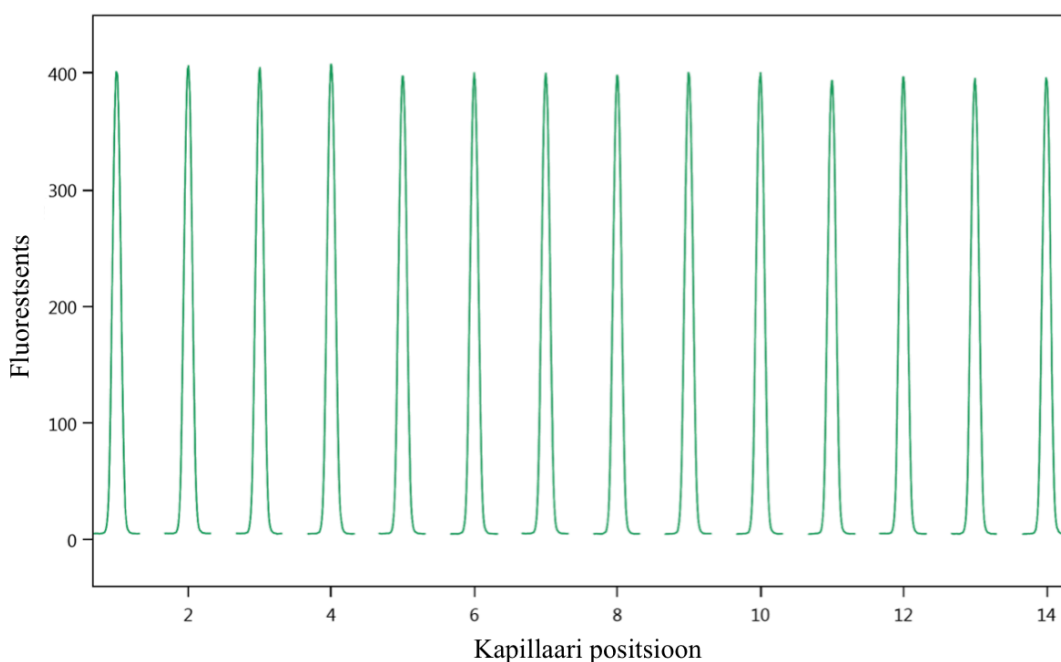
**Joonis 4. Skemaatiline MST masina ehitus.** (Muudetud joonis Jerabek-Willemsen et al., 2011)



**Joonis 5. Lahjendusrida 4  $\mu\text{l}$  klaaskapillaarides, mis on omakorda asetatud kandjale.** (NanoTemper Technologies GmbH, 2017)

Mikroskaalas termoforeesi töömehhanismi lühikokkuvõte:

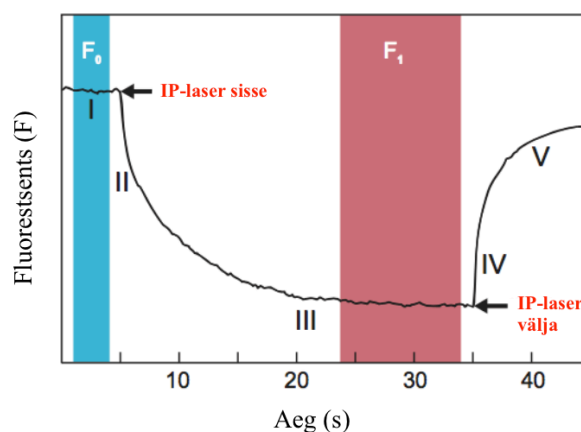
Kahe molekuli interaktsioonide uurimiseks on vaja üks neist liikumise detekteerimise eesmärgil märkida fluorofooriga. Tähtis on, et fluorofooriga märgitud molekuli kontsentratsioon hoitakse terve eksperimendi vältel konstantsena, see-eest mittemärgitud interaktsioonipartnerist luuakse lahjendusrida. Fluorestsentsi ja seega ka märgitud partneri ühtlast taset kapillaaride vahel on MST masinaga võimalik enne eksperimendi algust mõõta (Joonis 6) (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).



**Joonis 6. Kapillaaride fluorestsentsi intensiivsus.**

MST aparaat loob üksteise järel igasse kapillaari temperatuurigradiendi ja mõõdab fluorestsentsi intensiivsust. Järgnevalt on kirjeldatud MST masina tööprotsess ühe kapillaari näitel (Joonis 7):

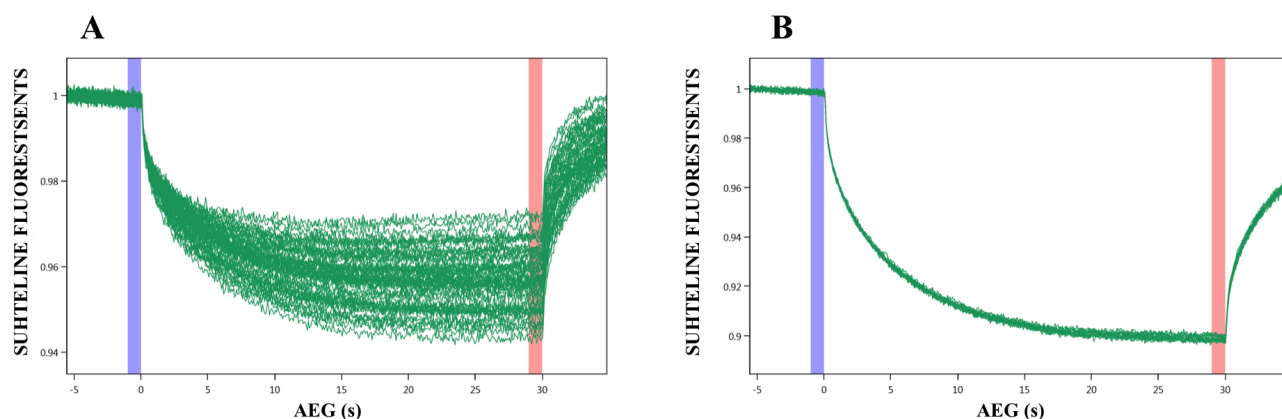
Esimesed 5 sekundit detekteerib masin fluorestsentsi intensiivsust ( $F_0$ ) tavaolekus (faas I). Seejärel lülitub sisse IP-laser ning algab temperatuurigradiendi loomine. Vahetult pärast IP-laseri käivitamist on märgata tugev fluorestsentsi intensiivsuse kadu, mis on tingitud temperatuuri mõjust fluorofoorile (faas II), seda nimetatakse ka temperatuuri hüppeks (T-hüpe). Temperatuurigradiendi tekkimisel liiguvad molekulid kuumutamistsentrist eemale, mida on märgata fluorestsentsi järkjärgulise vähenemisena (faas III). Molekulide suunatud liikumine tasakaalustub teatud hetkel massidifusiooniga ning fluorestsentsi intensiivsus jääb püsima ( $F_1$ ). 35 sekundit pärast katse algust lülitatakse IP-laser välja, misjärel on jällegi märgata T-hüpet (faas IV). IP-laseri väljalülitamisel hakkab temperatuurigradient kiiresti kaduma, mis toob endaga kaasa järkjärgulise molekulide tagasivoo ning fluorestsentsi intensiivsuse kasvu (faas V) (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).



**Joonis 7. Skemaatiline graafik fluorestsentsi muutusest MST ajal.** (Muudetud joonis Seidel et al., 2013)

Molekulidevahelise interaktsiooni detekteerimiseks ja selle iseloomustamiseks on oluline just lahjendusrea analüüsimine. Soovituslik on valida kontsentratsioonid nii, et kõige madalamate kontsentratsioonidega proovides oleks võimalik mõõta eelkõige seondumata märgitud molekulide liikumist. Kõrgeim kontsentratsioon peaks olema prognoositavast dissotsiatsioonikonstandist ( $K_D$ ) kõrgem, soovituslikult kuni 20 korda. Selline kontsentratsiooni valik on vajalik selleks, et oleks võimalik mõõta täielikult interakteerunud molekulide liikumist. Millise koefitsiendiga analüüdi kontsentratsioon muutub on eksperimentaatori enda valik (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).

Interaktsiooni toimumisel muutub märgitud valgu liikumine temperatuurigradiendis ning seda on hästi märgata eri kontsentratsioonidel tekkivate jälgede graafikul. Joonisel 8 on toodud kaks graafikut, kus graafikul A toimub interaktsioon ning ligandi kontsentratsioonist sõltuvalt muutub detekteeritava valgu liikumine ja graafikul B, kus interaktsiooni ei toimu ning erinevatel partnermolekuli kontsentratsioonidel märgitud valgu liikumine ei muutu. Teisisõnu – graafik A kirjeldab interaktsiooni toimumist, graafik B mitte (NanoTemper Technologies GmbH, 2017).



**Joonis 8. Partnermolekuli kontsentratsioonist sõltuv (A) ja sõltumatu (B) märgitud valgu liikumine temperatuurigradiendis. Mikroskaalas termoforees.**

Antud uurimistöös kasutati mikroskaalas termoforeesi läbiviimiseks puhvrit: 10mM Na-fosfaat puhver pH 7,4, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM KCl, 150mM NaCl ja 0,05% Tween-20 (Tyedmers et al., 2000). Lisaks kasutati mõningates MST eksperimentides ATP-d (A2383, Sigma-Aldrich), ADP-d (A5285, Sigma-Aldrich) ning AMP-PNP-d (10102547001, Roche). Kasutatud kapillaarid olid *premium*-kattega. Tegemist on kapillaaridega, mis on spetsiaalse polümeeriga kovalentselt kaetud, et vähendada molekulide adsorptsiooni ja agregeerumist kapillaari pinnale. Kõikide interaktsioonide uurimiseks hoiti MST masina Monolith NT. 115 analüüsikambri sisetemperatuur konstantselt 25°C. Andmete analüüs viidi läbi NanoTemperi MO Affinity Analysis programmi versiooni 2.1.2 ja Microsoft Excelit kasutades. Fluorofoori ergastamiseks kasutatud laseri (LED laser) intensiivsus BiP-His-Alexa-647 jaoks oli 100% ja MANF-NHS-Alexa-647 jaoks 50% ning temperatuurigradiendi loomiseks kasutatud IP-laseri intensiivsus oli mõlemal juhul 20%.

Mikroskaalas termoforeesi tulemuste graafikudel esitlemisel kasutame ajahetkede  $F_1$  ja  $F_0$  normaliseeritud fluorestsentside vahet, mis on korrutatud koefitsiendiga 1000, saades ühikuks ‰.

$K_D$ -d on arvutatud NanoTemperi MO Affinity Analysis programmi versiooni 2.1.2 algoritmi kasutades, mis matemaatilise valemiga väljendades on:

$$F_B = \frac{1}{2 c_A^0} \left( c_T^0 + c_A^0 + K_d - \sqrt{(c_T^0 + c_A^0 + K_d)^2 - 4 c_T^0 c_A^0} \right)$$

$F_B$  – märgitud molekuli seotud fraktsioon interaktsioonipartneri kõrgeimal kontsentratsioonil, mis võrdsustatakse 1-ga

$c_A^0$  – märgitud molekuli kontsentratsioon

$c_T^0$  – interaktsioonipartneri kontsentratsioon

$K_D$  – dissotsiatsioonikonstant

$c_{AT}$  – tekkinud kompleksi kontsentratsioon

$K_D$  veapiirina on kasutatud standardviga. Graafikudel on toodud mõõtmistulemuste varieeruvus.

Kõiki eksperimente korraldati sõltumatult vähemalt kaks korda, mõõtes iga eksperimendi käigus kõiki kapillaare kolm korda.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 MANF-i kontsentratsiooni mõõtmistulemused

MANF-i kontsentratsiooni leidmiseks kasutati Thermo Scientific'u NanoDrop'i nimelist spektrofotomeetrit lainepikkustel 280nm ja 650nm. Mõõtmistulemused on toodud Tabelis 1.

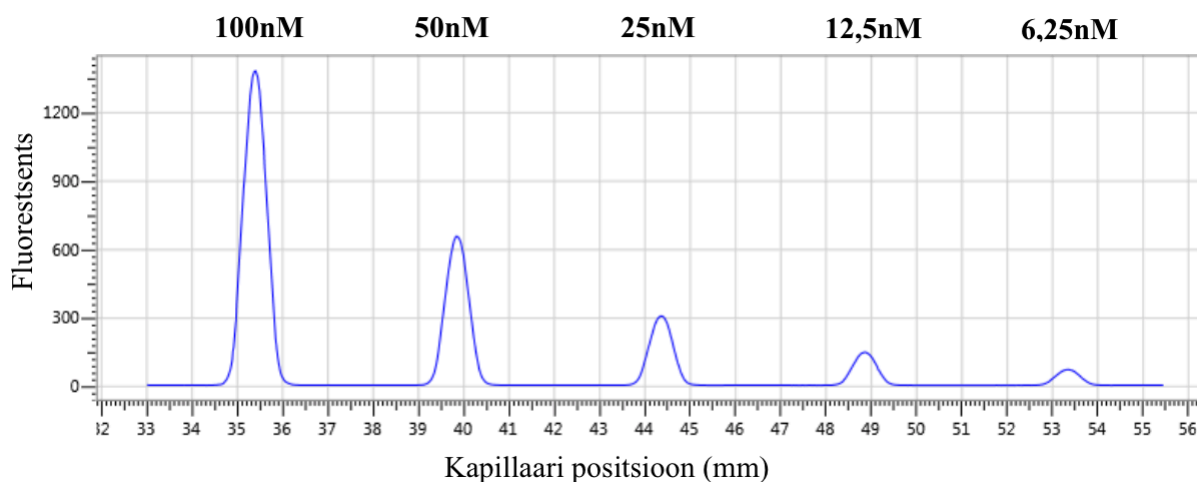
**Tabel 1. MANF-i spektrofotomeetri mõõtmistulemused lainepikkustel 280nm ja 650nm.**

$A_{280}$	$A_{650}$
1. 0,164	1. 1,034
2. 0,202	2. 0,551
3. 0,174	3. 1,041
Aritmeetiline keskvärtus: 0,180	Aritmeetiline keskvärtus: 0,875

MANF-i kontsentratsiooniks saime 0,17mg/ml ehk 9,44 $\mu$ M ning mikroskaalas termoforeesi mõõtmistel otsustasime kasutada lõppkontsentratsioonina 50nM. Märkimise efektiivsuseks arvutasime 0,39 värvi mooli MANF-i mooli kohta.

### 2.3.2 Märgitud BiP-i töölahjenduse määramine

Optimaalse märgitud BiP-i kontsentratsiooni leidmiseks analüüsiti kontsentratsioonide 100nM, 50nM, 25nM, 12,5nM ning 6,25nM fluorestsentsi intensiivsust 100% LED laseri võimsuse juures (Joonis 9).



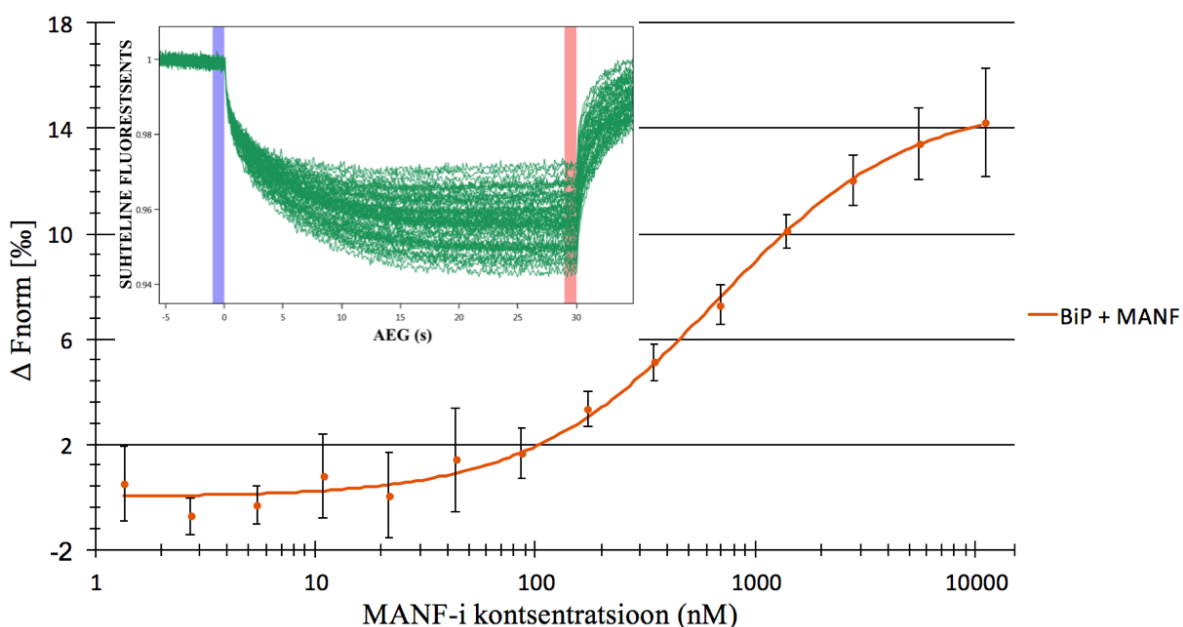
**Joonis 9. Märgitud BiP-i lahjenduste fluorestsentsi intensiivsuse analüüs.**

Kuna tootja juhiste kohaselt on optimaalne fluorestsentsi intensiivsuse vahemik 200-1500 ühikut ning seda võimalikult väikese märgitud molekuli kontsentratsiooni juures, siis antud töös valiti valk-valk interaktsioonide uurimiseks kõige optimaalsemaks BiP-His-Alexa-647 kontsentratsiooniks 20nM.

Kuigi märgitud BiP-i kontsentratsiooni ei olnud selle madala kontsentratsiooni tõttu võimalik eksperimentaalselt mõõta, siis BiP-i märkimine kõigi eelduste kohaselt õnnestus.

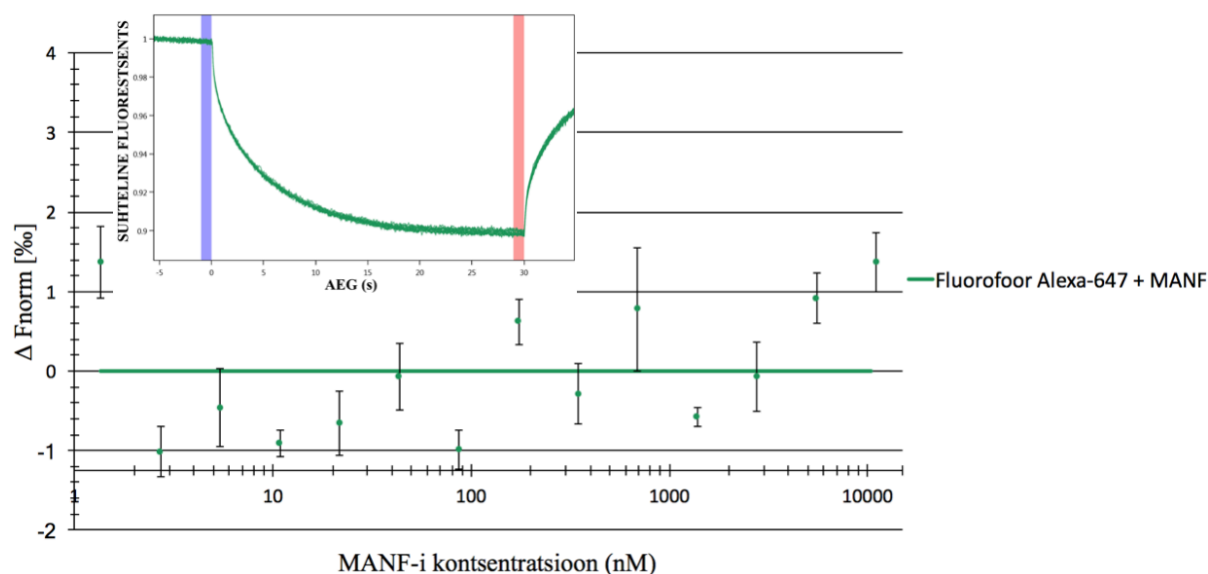
### 2.3.3 Mikroskaalas termoforeesi mõõtmistulemused

Glembotski avaldas koos oma kaastöötajatega 2012. aastal teadustöö, milles ristsidumist ning immuunsadestamist kasutades näitasid, et BiP-i ja MANF-i vahel toimub interaktsioon ning see on  $\text{Ca}^{2+}$  ionidest sõltuv. Artiklis kasutatud meetoditega on küll võimalik näidata interaktsiooni toimumist aga mitte seda, kas interaktsioon toimub otse kahe uuritava valgu vahel või kaudselt läbi suurema valgukompleksi. Seetõttu soovisime antud interaktsiooni ja ühtlasi ka MANF-i rolli paremaks mõistmiseks uurida, kas MANF-i ja BiP-i interaktsioon on otsene ning tõesti  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv. Selleks kasutasime puhastatud rekombinantseid valke: inimese MANF-i ning hamstri BiP-i. BiP-i märkisime fluorofooriga Alexa-647 ning MANF-i kasutasime ligandina. Mikroskaalas termoforeesi tulemused näitavad, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon on otsene ning toimub ka  $\text{Ca}^{2+}$  ionide puudumisel. Interaktsiooni dissotsiatsioonikonstant antud temperatuuri- ja puhvritingimuste juures oli  $K_D = 675 \pm 38 \text{ nM}$  (Joonis 10).



**Joonis 10. BiP-i ja MANF-i vahelise interaktsiooni analüüs ilma  $\text{Ca}^{2+}$  ionideta.** Nii doossõltuval kui ka molekulide liikumisjälgede graafikult on näha, et BiP-i ja MANF-i vahel toimub otsene interaktsioon tugevusega  $K_D = 675 \pm 38 \text{ nM}$ . Mikroskaalas termoforees.

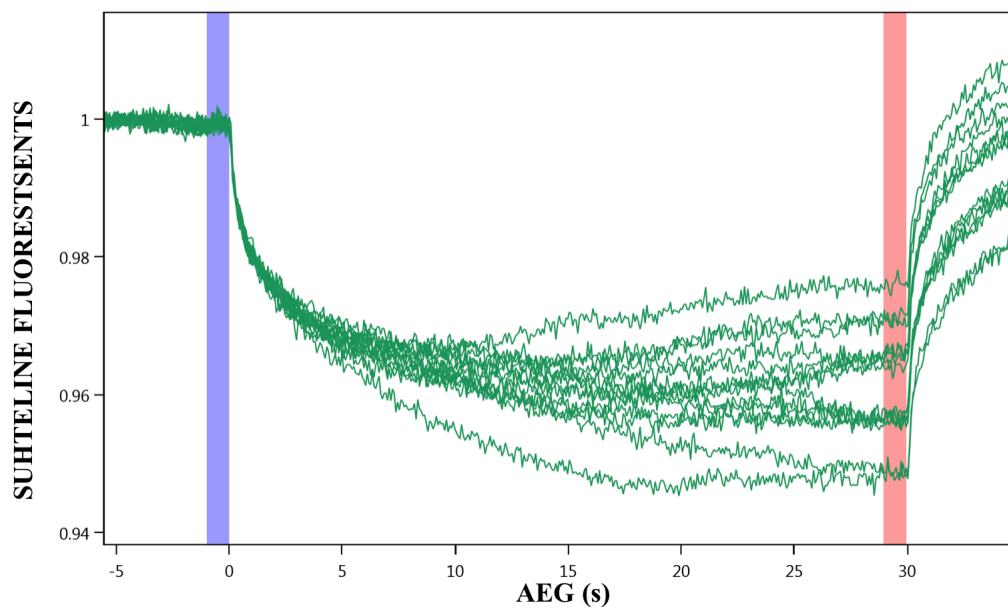
Kontrollimaks seda, et interaktsioonid mida me detekteerime on BiP-i ja MANF-i, mitte fluorofoori ja MANF-i vahelised, kasutasime fluorofoori Alexa-647 värvilahust mikroskaalas termoforeesis koos MANF-i lahjendureaga (Joonis 11). Fluorofoori värvilahuse kontsentratsioon oli sama nagu BiP-i valk-valk interaktsioonide uurimiseks MANF-iga.



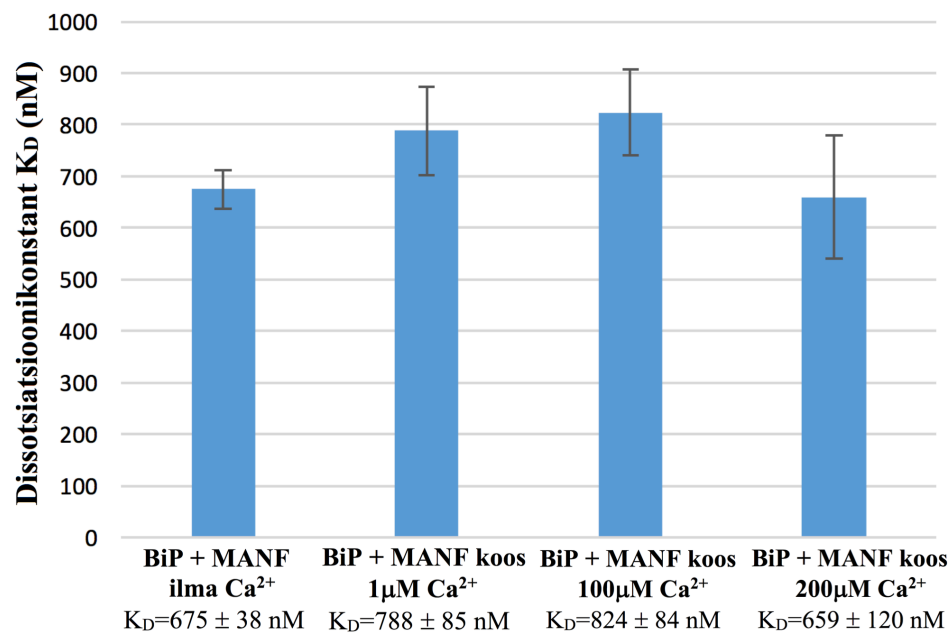
**Joonis 11. Fluorofoor Alexa-647 ja MANF-i vahelise interaktsiooni analüüs.** Fluorofoori Alexa-647 ja MANF-i vahel interaktsiooni ei toimu. Mikroskaalas termoforees.

Interaktsiooni toimumine  $\text{Ca}^{2+}$  ionide puudumisel ei anna infot selle kohta, mismoodi interaktsioon toimub  $\text{Ca}^{2+}$  ionide juuresolekul. Seetõttu, et paremini mõista  $\text{Ca}^{2+}$  ionide rolli MANF-i ja BiP-i interaktsioonis, viisime läbi mikroskaalas termoforeesi nelja erineva  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni juures ( $1\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$  ja  $500\mu\text{M}$ ). Huvitav ning tähelepanuväärne on, et MANF hakkas agregeeruma ning lahusest välja sadenema  $500\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni juures, seetõttu on ka doossõltuv kõver teistest eristuv ning mõõdetud punktid suure varieeruvusega. Agregatsioonile viitavad lisaks visuaalsele tähelepanekule ka MST-s mõõdetud jäljed, kust on selgelt näha ebakorrapärane ning hüplik molekulide liikumine (Joonis 12). Seega pole võimalik kõige kõrgema  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooniga tehtud mõõtmiste tulemusi ülejäänud tulemustega võrrelda. Ülejäänud mõõtmiste võrdlemisel selgub aga, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon ei ole  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv, dissotsiatsioonikonstant jäi samaks ka  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni tõstmisel 200 korda (Diagramm 1 ja Joonis 13).

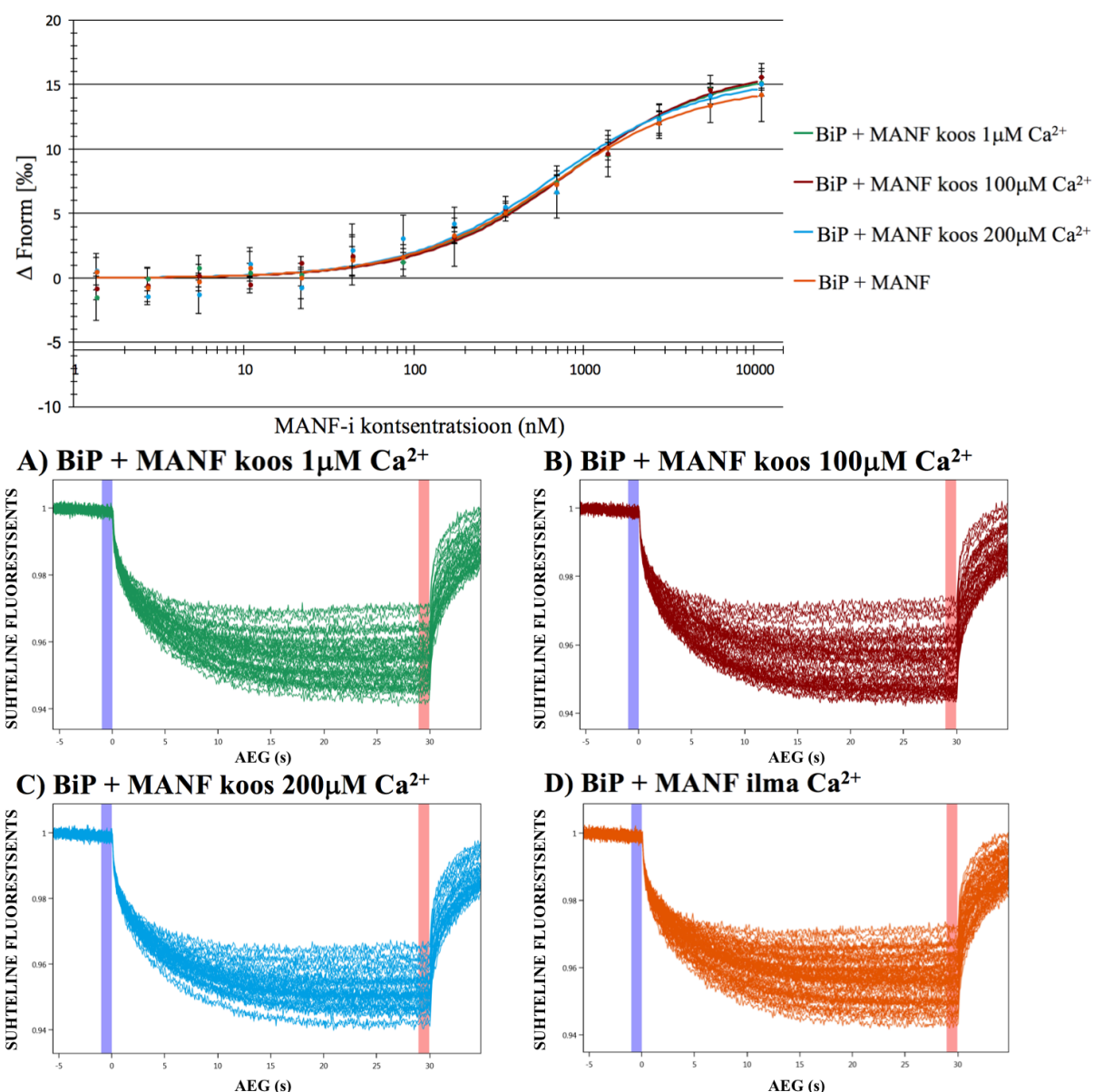




**Joonis 12. BiP-i interaktsioon MANF-iga koos 500 $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ ioonidega.** Molekulide liikumisjälgedelt on selgelt näha ebakorrapärane ning hüplik liikumine. Mikroskaalas termoforees.



**Diagramm 1. BiP-i ja MANF-i vahelised dissotsiatsioonikonstandid ilma ning koos 1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M ja 200 $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ ioonidega.**



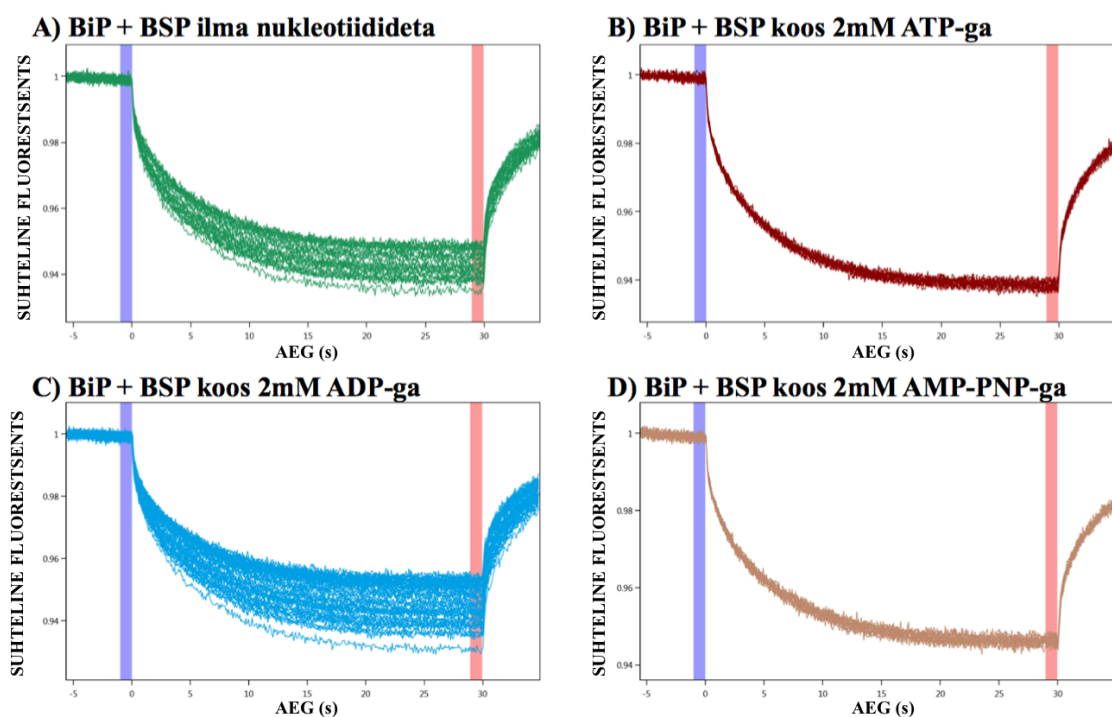
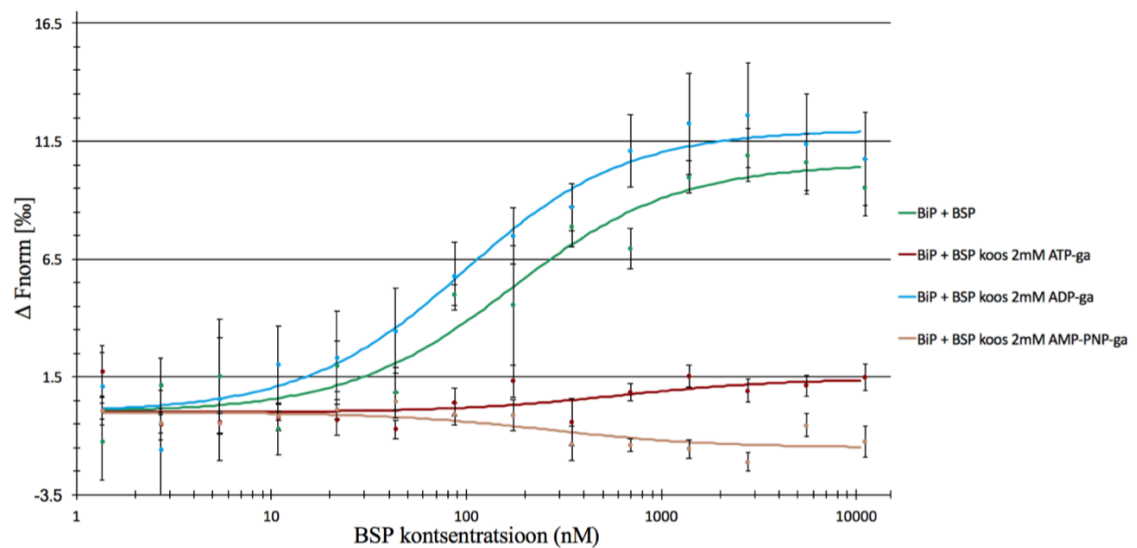
**Joonis 13. BiP-i interaktsioonid MANF-iga ilma ning koos 1µM, 100µM ja 200µM  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega.** Nii doossõltuval kui ka molekulide liikumisjälgede graafikutelt A), B), C) ja D) on näha, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon ei muutu  $\text{Ca}^{2+}$  ionide lisamisel. Mikroskaalas termoforees.

Kuna BiP-i näol on tegemist peamise ja seega väga olulise ER-is paikneva Hsp70 valkude perekonda kuuluva šaperoniga ning tema kontsentratsioon ER-i luumenis on väga kõrge, siis interakteeruvad BiP-iga väga paljud valgud. Valk-valk interaktsioonide andmebaasi PINA2 andmetel on hiire BiP-il 2535 ning inimese BiP-il 394 kirjeldatud erinevat interaktsiooni (Wu et al., 2009; Cowley et al., 2012). Väga paljud Bip-iga interakteeruvatest valkudest tuntakse BiP-i poolt ära kui substraadid, mis vajavad voltimist. Samas on BiP-il mitmed kofaktorid, mis reguleerivad BiP-i aktiivsust ja funktsiooni (Melnik, Rieger ja Zimmermann, 2014). Seetõttu järgmiseks analüüsiti kas interaktsioon, mida me näeme BiP-i ja MANF-i vahel, on substraattüüpi. Selleks mõõdeti esmalt BiP-i interaktsiooni substraati mimikeeriva peptiidiga BSP ilma nukleotiiditeta ning koos ATP, ADP ja AMP-PNP-ga, mille lõppkontsentratsioon

puhvril oli 2mM. Saadud tulemused on heas kooskõlas kirjandusega, mis kirjeldavad BiP-i mehhanismi – ilma nukleotiidideta BiP interakteerus BSP-ga afiinsusega  $K_D = 161 \pm 44$  nM, ADP juuresolekul sulgub BiP-i “kaas”, mille tagajärjel substraatmolekul jääb aktiivtsentrisse kinni ning interaktsioon BiP-i ja substraadi vahel on märksa tugevam,  $K_D = 88 \pm 17$  nM. Siinkohal on vajalik ka märkida, et ilma nukleotiidita BiP-i struktuur on üsna sarnane ADP-ga seondunud BiP-i struktuuriga, mis seletab ka nende kahe vormi sarnast  $K_D$ -d substraatpeptiidi sidumisel (Marcinowski et al., 2011). ATP või AMP-PNP juuresolek takistab BiP-i ja BSP vahelise interaktsiooni, sest BiP-i substraati siduva domeeni “kaas” on lahti ning substraatmolekulid saavad vabalt edasi-tagasi liikuda (Tabel 2 ja Joonis 14).

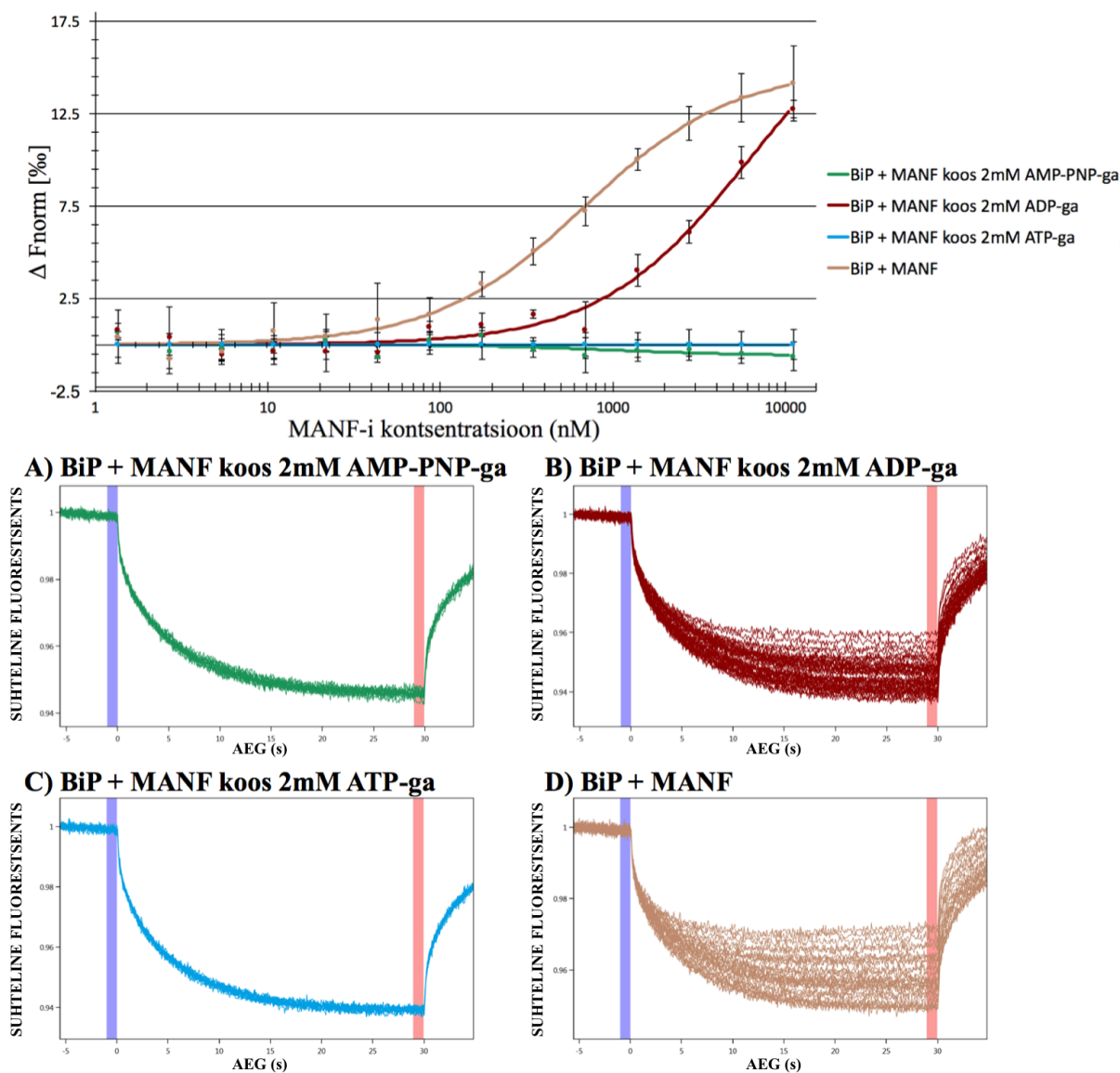
**Tabel 2. BiP-i ja BSP vahelised dissotsiatsioonikonstandid ilma ning koos 2mM ADP, ATP ning AMP-PNP**

BiP + BSP	BiP + BSP koos 2mM ADP-ga	BiP + BSP koos 2mM ATP-ga	BiP + BSP koos 2mM AMP-PNP-ga
$K_D = 161 \pm 44$ nM	$K_D = 88 \pm 17$ nM	Sidumist ei toimu	Sidumist ei toimu



**Joonis 14. BiP-i interaktsioonid substraadmolekuliga ilma ning koos ATP, ADP ja AMP-PNP-ga.** Nii doossõltuval kui ka molekulide liikumisjälgede graafikutelt A) ja C) on näha, et BiP-i ja BSP vahel toimub otsene interaktsioon, mis ADP lisamisel nõrgeneb. Seevastu doossõltuval ja liikumisjälgede graafikutelt B) ja D) selgub, et 2mM ATP ja AMP-PNP inhibeerivad interaktsiooni. Mikroskaalas termoforees.

BiP-i ja MANF-i vahelise interaktsiooni analüüs nukleotiidide juuresolekul viidi läbi samadel tingimustel kui substraadmolekuliga. Andmetest nähtub, et nii ATP kui ka AMP-PNP rikuvad BiP-i ja MANF-i vahelise interaktsiooni täielikult, seevastu ADP muudab interaktsiooni 10 korda nõrgemaks. Nendest tulemustest me järeldame, et MANF pole BiP-i jaoks substraat, sest vastasel juhul peaks ADP lisamisel interaktsiooni tugevus suurenema. Seetõttu võib oletada, et nende vaheline interaktsioon pole šaperoni ja substraadi omavaheline sidumine, vaid on pigem kofaktortüüpi (Joonis 15 ja Tabel 3).



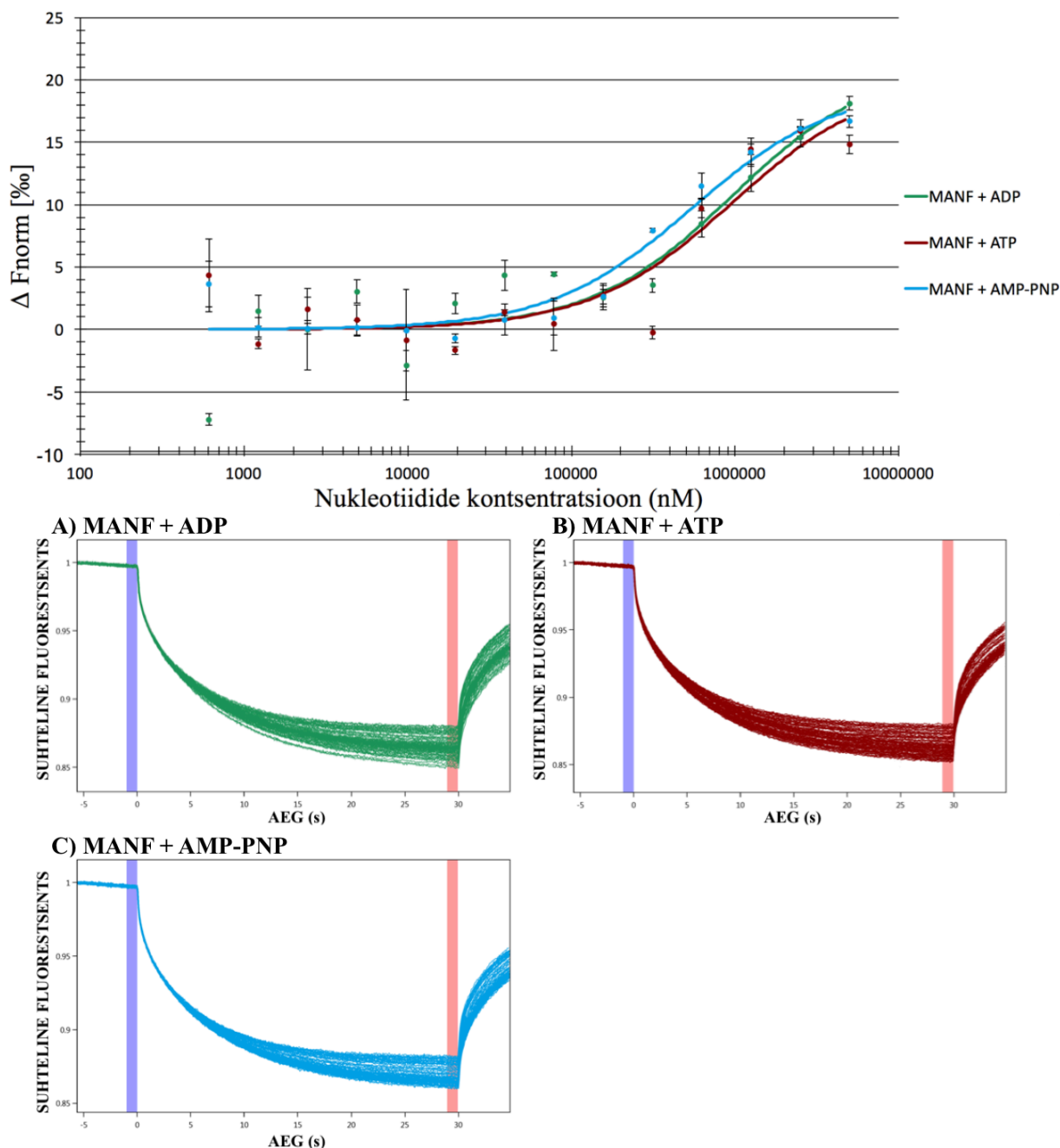
**Joonis 15. BiP-i ja MANF-i vahelise interaktsiooni analüüs ilma ning koos 2mM ATP, ADP ja AMP-PNP-ga.** Nii doossõltuval kui ka molekulide liikumisjälgede graafikutelt B) ja D) on näha, et BiP-i ja MANF-i vahel toimub interaktsioon. Seevastu doossõltuval ja liikumisjälgede graafikutelt A) ja C) selgub, et 2mM ATP ja AMP-PNP inhibeervad interaktsiooni. Mikroskaalas termoforees.

**Tabel 3. BiP-i ja MANF-i vahelised dissotsiatsioonikonstandid ilma ning koos 2mM ADP, ATP ning AMP-PNP.**

BiP + MANF	BiP + MANF koos 2mM ADP-ga	BiP + MANF koos 2mM ATP-ga	BiP + MANF koos 2mM AMP-PNP-ga
$K_D = 675 \pm 38 \text{ nM}$	$K_D = 6119 \pm 1162 \text{ nM}$	Sidumist ei toimu	Sidumist ei toimu

Kuna eelnevad tulemused viitavad, et MANF-i interaktsioon BiP-iga ei ole substraattüüpi, on üllatav, et ATP ja AMP-PNP juuresolekul nendevaheline interaktsioon kaob. Samas teised teadlased on näinud viiteid sellele, et MANF võib olla võimeline siduma nukleotiide (A. Eesmaa, M. Saarma ja P. Permi, isiklik kommunikatsioon). Seetõttu uurisime MST abil, kas

MANF on võimeline siduma ATP, ADP ja AMP-PNP-d. Näitame esmakordselt, et MANF seob otseselt neid adenosiin-nukleotiide. Dissotsiatsioonikonstandid ADP, ATP ja AMP-PNP sidumisel märgitud MANF-ile olid vastavalt  $K_D = 964 \pm 453 \mu\text{M}$ ,  $K_D = 955 \pm 414 \mu\text{M}$   $K_D = 545 \pm 117 \mu\text{M}$  (Joonis 16 ja Tabel 4).

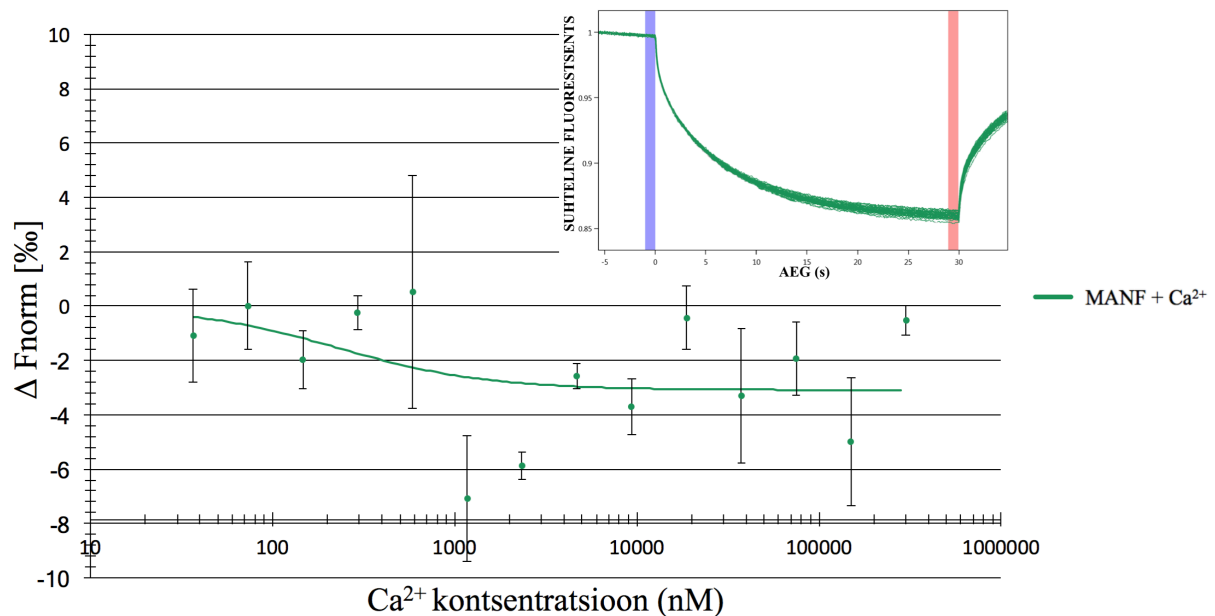


**Joonis 16. MANF-i interaktsioonid ATP, ADP ja AMP-PNP-ga.** Nii doossõltuval kui ka kõikidelt molekulide liikumisjälgede graafikutelt A), B) ja C) on näha, et BiP-i ja MANF-i vahel toimub otsene interaktsioon. Mikroskaalas termoforees.

**Tabel 4. MANF-i ja ADP, ATP ning AMP-PNP vahelised dissotsiatsioonikonstandid.**

MANF + ADP	MANF + ATP	MANF + AMP-PNP
$K_D = 964 \pm 453 \mu\text{M}$	$K_D = 955 \pm 414 \mu\text{M}$	$K_D = 544 \pm 117 \mu\text{M}$

Kuna on teada, et suur osa signaalradasid ER-is on sõltuvad  $\text{Ca}^{2+}$ -st ning paljud ER-is paiknevad valgud seovad  $\text{Ca}^{2+}$  ning MANF-i ja BiP-i interaktsiooni analüüsimisel nägime, et kõrgemate  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonide juures MANF sadenes lahusest välja, siis uurisime lisaks, kas MANF on võimeline  $\text{Ca}^{2+}$  siduma. Mingisugust interaktsiooni ei täheldatud (Joonis 17).



**Joonis 17. MANF-i ja  $\text{Ca}^{2+}$  vahelise interaktsiooni analüüs.** Nii doossõltuval kui ka molekulide liikumisjälgede graafikult on näha, et MANF ei interakteeru  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega. Mikroskaalas termoforeesi.

## Arutelu

Mikroskaalas termoforeesi tulemused toetasid Glembotski ja tema kaastöötajate hüpoteesi, mille kohaselt interakteeruvad ER-i šaperon BiP ning närvikasvufaktor MANF. Ühtlasi näitame esmakordselt, et BiP-i ja MANF-i vaheline sidumine on otsene. Erinevalt Glembotski ja tema kaasautorite tulemustest näitame käesoleva töö raames, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon pole  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv. Seda kinnitavad meie tulemused, mille kohaselt BiP-i ja MANF-i omavaheline sidumine toimub *in vitro* ilma  $\text{Ca}^{2+}$  ionide juuresolekuta ning  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni tõstmine sidumise tugevust ei muuda. On võimalik, et Glembotski ja tema kaastöötajate poolt täheldatud MANF-i ja BiP-i vahelise interaktsiooni nõrgenemist ei põhjustanud mitte  $\text{Ca}^{2+}$  väljavool ER-ist, vaid hoopis ATP kontsentratsiooni tõus ER-i luumenis. Endoplasmaatilise retiikulumi  $\text{Ca}^{2+}$  ja ATP kontsentratsioonide pöördvõrdeline seos ER-is on kirjeldatud teadustöös, mis avaldati 2014. aastal (Vishnu et al., 2014). Selle hüpoteesiga on heas kooskõlas siinses uurimistöös läbiviidud mikroskaalas termoforeesi tulemused, mis esmakordselt näitavad, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon kaob täielikult 2mM ATP või ATP hüdrolysimatu analoogi AMP-PNP juuresolekul. Samas, kuna antud töös kasutatud tingimused ei kajasta kindlasti *in vivo* olukorda ER-i luumenis, siis ei saa

väljastada, et BiP-i ja MANF-i vahelises interaktsioonis või selle reguleerimisel osalevad *in vivo* veel teised valgud, mis meie katsest puudusid. Selliste valkude olemasolul võib oletada, et nende aktiivsus või võime MANF-i ja BiP-i interaktsiooni tugevust reguleerida sõltub ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonist.

BiP on peamine ER-is leiduv šaperon ning temaga interakteeruvate molekulide spekter on äärmiselt lai. Üldistatult võib need jagada kahte klassi – substraatideks ning kofaktoriteks. Sellest tulenevalt on oluline välja selgitada millist tüüpi interaktsioon toimub BiP-i ja MANF-i vahel. Siinses töös kasutati selle välja selgitamiseks ADP, ATP ja AMP-PNP lisamist puhvrise, sest BiP-i konformatsioon ja seeläbi ka interaktsioonid substraatide ja teiste valkudega, on otseselt sõltuvad ATP-st ja ADP-st. Selleks, et MST-d kasutades mõista, kuidas mõjutavad nukleotiidid BiP-i ja substraatmolekulide sidumist, kasutasime näidissubstraadina väikest, 7 aminohappelist peptiidi, mis sarnaneb immuunoglobuliini raskes ahelas konserveerunud järjestusele ning mimikeerib BiP-le tema levinud substraati. BiP-i ja substraadi omavahelise interaktsiooni tugevuse mõõtsime mikroskaalas termoforeesiga  $K_D = 161 \pm 44$  nM. 5mM ADP lisamisel puhvrise tõusis interaktsiooni tugevus kaks korda,  $K_D = 88 \pm 17$  nM, olles kirjandusest leiduva BiP-i ATP-assest tsüklilist sõltuva šaperonile iseloomuliku töömehhanismiga hästi kooskõlas. Kui muidu ADP juuresolekul interaktsiooni afiinsus BiP-i ja tema substraatide vahel tõuseb, siis MANF-i puhul langes see 10-kordselt. See on kaudne vihje, et MANF pole BiP-i jaoks substraatmolekul ning tõenäoliselt nendevaheline interaktsioon täidab mõnda muud bioloogilist funktsiooni. Siit oleks huvitav ning vajalik jätkata MANF-i ja BiP-i vahelise interaktsiooni uurimist detailsemalt, kasutades näiteks tuumamagnetresonants spektroskoopiat, mille abil oleks võimalik kindlaks teha millised BiP-i ja MANF-i domeenid sidumises osalevad.

Hetkel pole selge, kas ATP ja AMP-PNP lisamisest tingitud BiP-i ja MANF-i interaktsiooni kadu tuleneb MANF-i või BiP-i konformatsiooni muutustest. On hästi teada, et BiP-i konformatsioon ja šaperonile omane aktiivsus sõltuvad tugevalt tema ATP-aasest tsüklilist. Samas nukleotiidide mõju MANF-i konformatsioonile pole varem kirjeldatud. Väärib märkimist, et kuigi MANF sidus kõiki kolme testitud nukleotiidi sarnase afiinsusega, siis BiP-i ja MANF-i interaktsiooni mõjutas ADP teistmoodi kui ATP või AMP-PNP. Seetõttu võib oletada, et adenosiin-nukleotiididest tingitud MANF-i ja BiP-i kompleksi lagunemine on tingitud peamiselt muutustest BiP-i konformatsioonis, kuid väljastada ei saa ka MANF-i konformatsiooni muutuse mõju. Ühtlasi viitavad meie andmed, et MANF seob eelistatult BiP-i nukleotiididega sidumata vormi. Milline on BiP-i ja MANF-i vahelise interaktsiooni ning selle nukleotiididest sõltuva regulatsiooni bioloogiline funktsioon näitab edasine uurimistöö.



Lisaks on käesolevas töös veel üks äärmiselt huvitav leid, et MANF on võimeline siduma nii ADP-d, ATP-d kui ka AMP-PNP-d, dissotsiatsioonikonstantidega vastavalt  $K_D = 964 \pm 453 \mu\text{M}$ ,  $K_D = 955 \pm 414 \mu\text{M}$  ja  $K_D = 544 \pm 117 \mu\text{M}$ . Mõõdetud dissotsiatsioonikonstandid võivad tunduda esmapilgul küll kõrged, kuid samas on ka ATP kontsentratsioonid ER-is üsna kõrged, hinnanguliselt kuni 10mM. Seega on võimalik, et MANF-i võime siduda adenosiin-nukleotiide on oluline tema bioloogilise aktiivsuse regulatsioonis. Nende interaktsioonide bioloogiline tähtsus pole hetkel veel teada ning see vajab väljaselgitamiseks täiendavat uurimistööd. Samas oleks veel vajalik ning huvitav uurida MANF-i interaktsioone AMP-ga, adenosiiniga aga ka GTP-ga.

Käesolevas töös läbiviidud interaktsioonide analüüsid oleks vajalik läbi viia ka MANF-i paralooži CDNF-iga, et paremini mõista nende kahe väga sarnase närvikasvufaktori molekulaarseid mehhanisme rakus.

Samuti vajab edasist uurimistööd MANF-i ja CDNF-i võimalikud interaktsioonid ER-i transmembraansete UPR sensoritega.

ER-is lokaliseeruvate valkude interaktsioon  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega on levinud ning seetõttu uuriti käesolevas töös MANF-i ja  $\text{Ca}^{2+}$  ionide vahelist interaktsiooni. Mingisugust interaktsiooni ei täheldatud, samas on huvitav, et MANF hakkas agregeeruma ning sadenema  $500\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  juures.

## Kokkuvõte

Käesoleva uurimistööga selgitati välja, et šaperoni BiP-i ja närvikasvufaktori MANF-i vahel toimub otsene interaktsioon afiinsusega  $K_D = 675 \pm 38 \text{ nM}$  ning see ei ole  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv nagu Glembotski koos oma kaastöötajatega arvasid, vaid sõltub ATP-st. Samuti on oluline märkida, et esialgsed andmed viitavad, et BiP-i ja MANF-i vaheline interaktsioon on kofaktoritüüpi.

Lisaks uuriti MANF-i interaktsioone madalmolekulaarsete ühenditega - ADP, ATP, AMP-PNP ning  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega. Siinses töös kirjeldatud andmed viitavad esmakordselt, et MANF on võimeline siduma neid nukleotiide, seevastu interaktsioon  $\text{Ca}^{2+}$  ionidega puudub täielikult.

## Summary

### **Interactions of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) with chaperone BiP and low-molecular-weight molecules**

Kristofer Nõges

#### Summary

Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has been found to promote the survival of midbrain dopaminergic neurons in animal models of Parkinson's disease (PD) and therefore it has very high therapeutic potential for the treatment of PD. However, still after 14 years of research the mechanisms of MANF's neuroprotective activity are unclear. Increasing evidence indicates that unlike other classical neurotrophic factors, MANF is localized in the endoplasmatic reticulum (ER) and its expression and secretion are regulated by unfolded protein response (UPR). Furthermore, current evidence indicates that MANF in turn regulates UPR. It has therefore been suggested that MANF may have an important biological function in the ER. The aim of this work was to study MANF protein-protein interactions with BiP, a chaperone located in the lumen of the ER, and with low-molecular-weight molecules - ADP, ATP, AMP-PNP and  $\text{Ca}^{2+}$ .

Using microscale thermophoresis we show for the first time that MANF and BiP interact directly with the affinity of  $675 \pm 38$  nM. We have found that contrary to what has been reported before by Glembotski, *et al.*, the interaction of MANF and BiP is  $\text{Ca}^{2+}$ -independent. We further investigated whether MANF interacts with BiP as a substrate or a cofactor by adding 2mM ADP, ATP or AMP-PNP to the reaction buffer. Typically the affinity of an interaction between a substrate and BiP increases when ADP is added, but instead the interaction affinity between MANF and BiP was decreased by 10-fold, which might indicate that MANF is a cofactor to BiP or vice versa.

In addition, we discovered that MANF interacts directly with ADP, ATP and AMP-PNP with the binding affinities ranging from 400 to 1400  $\mu\text{M}$ . The biological functions of these interactions are unknown and warrant further studies. No interaction between MANF and  $\text{Ca}^{2+}$  was observed.

#### Tänuõnad

Soovin avaldada tänu enda suurepärasele juhendajatele Ave Eesmaale, professor Mart Saarmale ja professor Ülo Langelile, kes leidsid minu jaoks alati aega, et analüüsida ning kommenteerida minu ideid ja tulemusi. Samuti suur aitäh Karleenile ning minu perele, kes igakülselt toetasid, inspireerisid ning julgustasid mind.

- Airavaara, M., Harvey, B. K., Voutilainen, M. H., ... Wang, Y. (2012). CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplantation* 21 (6): 1213-1223.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2014. The endoplasmic reticulum, p. 669-686. *In* Molecular Biology of the Cell, 6<sup>th</sup> ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2014. Misfolded proteins in the ER activate an unfolded protein response, p. 686-688. *In* Molecular Biology of the Cell, 6<sup>th</sup> ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
- Alder, N. N., Shen, Y., Brodsky, J. L., Hendershot, L. M., Johnson, A. E. (2005). The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 168 (3): 389-399.
- Alzheimer's Disease International. (2016). World Alzheimer report 2016.
- Apostolou, A., Shenc, Y., Liangc, Y., Luod, J., Fang, S. (2008). Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Experimental Cell Research* 314 (13): 2454–2467.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40: W597–W603.
- Bäck, S., Peränen, J. Galli, E., Pulkila, P., Lonka-Nevalaita, L., Tamminen, T., Voutilainen, M. H., Raasmaja, A., Saarma, M., Männistö, P. T., Tuominen, R. K. (2013). Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. *Brain and Behavior* 3 (2): 75-88.
- Barker, S., Weinfeld, M., Zheng, J., Li, L., Murray, D. (2005). Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33826-33838.
- Beis, I, Newsholm, E. A. (1975). The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscle from vertebrates and invertebrates. *The Biochemical Journal* 152: 23-32.
- Berger, C. L., Dong, Z., Hanlon, D., Bisaccia, E., Edelson, R. L. (1997). A lymphocyte cell surface heat shock protein homologous to the endoplasmic reticulum chaperone, immunoglobulin heavy chain binding protein BIP. *International Journal of Cancer* 71 (6): 1077–1085.

- Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J., Zimmermann, R. (1999). A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biological Chemistry* 380 (10): 1175-1182.
- Bruhn, H. (2005). A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochemical Journal* 389: 249-257.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415 (6867): 92-96.
- Carrara, M., Prisci, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C., Ali, M. M. U. (2015). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *eLIFE* e03522.
- Chen, X., Shen, J., Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15): 13045-13052.
- Cowley, M. J., Pinese, M., Kassahn, K. S., Waddell, N., Pearson, J. V., Grimmond, S. M., Biankin, A. V., Hautaniemi, S., Wu, J. (2012). PINA v2.0: mining interactome modules. *Nucleic Acid Research* 40: D862–D865.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., Johnson, A. E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78 (3): 461-471.
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A. G., ... Somlo, S. (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genetics* 36 (6): 575 - 577.
- Degen, E., Williams, D. B. (1991). Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *The Journal of Cell Biology* 112 (6): 1099-115.
- Fedeles, S. V., Tian, X., Gallagher, A. R., Mitobe, M., Nishio, S., Lee, S. H., Cai, Y., Geng, L., Crews, C. M., Somlo, S. (2011). A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nature Genetics* 43 (7): 639-647.
- Flaherty, K. M., Deluca-Flaherty, C., McKay, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346 (6285): 623-628.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A., Michalak, M. (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (36): 21522-21528.

- Flynn, G. C., Chappell, T. G., Rothman, J. E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245 (4916): 385-390.
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334 (6054): 358-362.
- Fu, Y., Li, J., Lee, A. S. (2007). GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Research* 67 (8): 3734-3740.
- Garcia-Huerta, P., Troncoso-Escudero, P., Jerez, C., Hetz, C., Vidal, R. L. (2016). The intersection between growth factors, autophagy and ER stress: A new target to treat neurodegenerative diseases? *Brain Research* 1649: 173–180.
- Gething, M.-J. 1997. Mammalian BiP, p. 61. *In* Gething, M.-J. (ed.), *Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts*. Oxford University Press.
- Glembotski, C. C., Thuerauf, D. J., Huang, C., Vekich, J. A., Gottlieb, R. A., Doroudgar, S. (2012). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (31): 25893-25904.
- Haas, I. G., Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306 (5941): 387 - 389.
- Haigh, N. G., Johnson, A. E. (2002). A new role for BiP: Closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *Journal of Cell Biology* 156 (2): 261-270.
- Hamilton, J. F., Morrison, P. F., Chen, M. Y., Harvey-White, J., Pernaute, R. S., Phillips, H., Oldfield, E., Bankiewicz, K. S. (2001). Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Experimental Neurology* 168 (1): 155-161.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M., Johnson, A. E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92 (6): 747-758.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell* 6 (5): 1099-1108.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397 (6716): 271-274.

- Hartley, C. L., Edwards, S., Mullan, L., Bell, P. A., Fresquet, M., Boot-Handford, R. P., Briggs, M. D. (2013). Armet/Manf and Creld2 are components of a specialized ER stress response provoked by inappropriate formation of disulphide bonds: implications for genetic skeletal diseases. *Human Molecular Genetics* 22 (25): 5262–5275.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell* 10 (11): 3787–3799.
- Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A., Evans, D. A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80 (19): 1778–1783.
- Hellman, M., Arumäe, U., Yu, L. Y., Lindholm, P., Peränen, J., Saarma, M., Permi, P. (2011). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (4): 2675–2680.
- Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y., Harvey, B. K. (2013). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (6): 4209–4225.
- Hendrick, J. P., Langer, T., Davis, T. A., Hartl, F. U., Wiedmann, M. (1993). Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (21): 10216–10220.
- Hetz, C., Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 233–249.
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 186 (3): 323–331.
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., Scheper, W. (2012). Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegenerative Diseases* 10: 212–215.
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A., Rozemuller, J. M., Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354 (3): 707–711.
- Hoseki, J., Sasakawa, H., Yamaguchi, Y., Maeda, M., Kubota, H., Kato, K., Nagata, K. (2010). Solution structure and dynamics of mouse ARMET. *FEBS Letters* 584 (8): 1536–1542.

- Imamura, H., Nhat, K. P. H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15651-15656.
- Izumi, T., Yokota-Hashimoto, H., Zhao, S., Wang, J., Halban, P. A., Takeuchi, T. (2003). Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52 (2): 409-416.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and Drug Development Technologies* 9 (4): 342-353.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K., Hendershot, L. M. (2008). Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *The EMBO Journal* 27 (21): 2873–2882.
- Kassenbrock, C. K., Kelly, R. B. (1989). Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *EMBO Journal* 8 (5): 1461–1467.
- Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2000). Molecular structure and tissue distribution of Matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 3999–4006.
- Kopra, J. J., Bjerkén, S., Porokuokka, L. L., Varendi, K., Olfat, S., Montonen, H., Piepponen, T. P., Saarma, M., Andressoo, J.-O., Panhelainen, A. (2017). Dampened amphetamine-stimulated behavior and altered dopamine transporter function in the absence of brain GDNF. *Journal of Neuroscience* 37 (6): 1581-1590.
- Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J., Johnson Jr, E. M., Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384 (6608): 467-470.
- Lai, C. W., Otero, J. H., Hendershot, L. M., Snapp, E. (2012). ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (11): 7969–7978.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S. V., ... Dudek, J. (2012). Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of Cell Science* 125 (8): 1958-1969.
- Latgé, C., Cabral, K. M. S., Almeida, M. S., Foguel, D. (2013). <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-NMR assignment of the N-terminal domain of human cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF). *Biomolecular NMR Assignments* 7 (1): 101–103.

- Latgé, C., Cabral, K. M. S., de Oliveira, G. A. P., ... Foguel, D. (2015). „The solution structure and dynamics of full-length human cerebral dopamine neurotrophic factor and its neuroprotective role against  $\alpha$ -synuclein oligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (33): 20527-20540.
- Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y., Williams, D. B. (2002). Localization of the Lectin, ERp57 Binding, and Polypeptide Binding Sites of Calnexin and Calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29686–29697.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology* 23 (21): 7448-7459.
- Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *The Lancet* 373 (9680): 2055–2066.
- Lewis, M. J., Mazzei, R. A., Green, M. (1985). Structure and assembly of the endoplasmic reticulum. The synthesis of three major endoplasmic reticulum proteins during lipopolysaccharide-induced differentiation of murine lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (5): 3050-3057.
- Li, H., Korennykh, A. V., Behrman, S. L., Walter, P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (37): 16113-16118.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D. R., Lee, A. S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation* 15 (9): 1460-1471.
- Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S., Lee, A. S. (2000). ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Molecular and Cellular Biology* 20 (14): 5096-5106.
- Lin, L. H., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., Collins, F. (1993). GDNF: A glial cell line - derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260 (5111): 1130-1132.
- Lindahl, M., Danilova, T., Palm, ... Saarma, M. (2014). MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic  $\beta$  cells. *Cell reports* 7 (2): 366-375.
- Lindholm, P., Peränen, J., Andressoo, J.-O., Kalkkinen, N., Kokaia, Z., Lindvall, O., Timmusk, T., Saarma, S. (2008). MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently



- regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39 (3): 356–371.
- Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., ... Saarma, M. (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448: 73-78.
- Lindström, R., Lindholm, P., Kallijärvi, J., Yu, L.-Y., Piepponen, T. P., Arumäe, U., Saarma, M., Heino, T. I. (2013). Characterization of the structural and functional determinants of MANF/CDNF in *Drosophila* in vivo model. *PLoS One* 8: e73928.
- Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J. S., Yuan, L. C., Klausner, R. D. (1988). Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell* 54 (2): 209-220.
- Liu, C. Y., Xu, Z., Kaufman, R. J. (2003). Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17680–17687.
- Liu, E. S., Lee, A. S. (1991). Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic Acid Research* 19 (19): 5425-5431.
- Love, S., Plaha, P., Patel, N. K., Hotton, G. R., Brooks, D. J., Gill, S. S. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nature Medicine* 11 (7): 703 - 704.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., Lee, A. S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5688-5697.
- Mätlik, K., Yu, L.-Y., Eesmaa, A., ... Arumäe, U. (2015). Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity. *Cell Death & Disease* 6: e2032.
- Marcinowski, M., Rosam, M., Seitz, C., Elferich, J., Behnke, J., Bello, C., Feige, M. J., Becker, C. F. W., Antes, I. (2013). Conformational selection in substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Journal of Molecular Biology* 425 (3): 466–474.
- Marcinowski, M., Höller, M., Feige, M. J., Baerend, D., Lamb, D. C., Buchner, J. (2011). Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (2): 150–158.
- Marín-Briggiler, C. I., González-Echeverría, M. F., Munuce, M. J., Ghersevich, S., Caille, A. M., Hellman, U., Corrigan, V. M., Vazquez-Levin, M. H. (2010). Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the

- recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertility and Sterility* 93 (5): 1574-1584.
- Matsumoto, A., Hanawalt, P. C. (2000). Histone H3 and heat shock protein GRP78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilyocarcin V in human fibroblasts. *Cancer Research* 60 (14): 3921-3926.
- Mayer, M. P., Laufen, T., Paal, K., McCarty, J. S., Bukau, B. (1999). Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 289 (4): 1131-1144.
- McCracken, A. A., Brodsky, J. L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *The Journal of Cell Biology* 132 (3): 291-298.
- Melnick, J., Aviel, S., Argon, Y. (1992). The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (30): 21303-21310.
- Melnyk, A., Rieger, H., Zimmermann, R. (2014). Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum. *Subcellular Biochemistry* 78: 179-200.
- Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K., Hartl, F.-U. (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (32): 19617-19624.
- Mizobuchi, N., Hoseki, J., Kubota, H., Toyokuni, S., Nozaki, J., Naitoh, M., Koizumi, A., Nagata, K. (2007). ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. *Cell Structure and Function* 32 (1): 41-50.
- Morshauser, R. C., Hu, W., Wang, H., Pang, Y., Flynn, G. C., Zuiderweg, E. R. P. (1999). High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *Journal of Molecular Biology* 289 (5): 1387–1403.
- Munro, S., Pelham, H. R. B. (1986). An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46 (2): 291-300.
- Munro, S., Pelham, H. R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48 (5): 899–907.
- Norisada, J., Hirata, Y., Amaya, F., Kiuchi, K., Oh-hashii, K. (2016). A comparative analysis of the molecular features of MANF and CDNF. *PLoS One* 11 (1): e0146923

- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P., Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *The EMBO Journal* 22 (5): 987 - 1234.
- Oh-hash, K., Tanaka, K., Koga, H., Hirata, Y., Kiuchi, K. (2012). Intracellular trafficking and secretion of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. *Molecular and Cellular Biochemistry* 363 (1): 35–41.
- Oh-Hashi, K., Hirata, Y., Kiuchi, K. (2013). Transcriptional regulation of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in Neuro2a cells. *Cellular and Molecular Biology Letters* 18 (3): 398-415.
- Ouyang, Y.-B., Xu, L.-J., Emery, J. F., Lee, A. S., Giffard, R. G. (2011). Overexpressing GRP78 influences Ca<sup>2+</sup> handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion* 11 (2): 279-286.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 109 (4): 525-532.
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S., Reinstein, J. (1997). GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* 36 (12): 3417-3422.
- Palgi, M., Greco, D., Lindström, R., Auvinen, P., Heino, T. I. (2012). Gene expression analysis of *Drosophila* Manf mutants reveals perturbations in membrane traffic and major metabolic changes. *BMC Genomics* 13 (134).
- Parkash, V., Lindholm, P. Peränen, J., Kalkkinen, N., Oksanen, E., Saarma, M., Leppänen, V.-M., Goldman, A. (2009). The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional. *Protein Engineering Design & Selection* 22 (4): 233-241.
- Peterson, J. R., Ora, A., Van, P. N., Helenius, A. (1995). Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Molecular Biology of the Cell* 6 (9): 1173–1184.
- Petrova, P. S., Raibekas, A., Pevsner, J., ... Commissiong, J. W. (2003). A new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *Journal of Molecular Neuroscience* 20 (2): 173–187.
- Philippova, M., Ivanov, D., Joshi, M. B., Kyriakakis, E., Rupp, K., Afonyushkin, T., Bochkov, V., Erne, P., Resink, T. J. (2008). Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol - anchored T-Cadherin on the surface of vascular

- endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-Cadherin-dependent cell survival. *Molecular and Cellular Biology* 28 (12): 4004–4017.
- Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C., Pastan, I. (1977). Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* 11 (4): 941-947.
- Prins, D., Michalak, M. (2011). Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004069.
- Pyrko, P., Schöenthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., Lee, A. S. (2007). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Research* 67 (20): 9809-9816.
- Randow, F., Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature Cell Biology* 3 (10): 891 - 896.
- Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P. C., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Letters* 514 (0): 122-128.
- Rao, R. V., Bredesen, D. E. (2004). Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Current Opinion in Cell Biology* 16 (6): 653-662.
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V. D., Latva-Ranta, M., Ruddock, L. (2007). A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors . *The Journal of Cell Biology* 179 (6): 1193-1204.
- Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., Lee, A. S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (23): 20915-20924.
- Robert, V., De Giorgi, F., Massimino, M. L., Cantini, M., Pozzan, T. (1998). Direct monitoring of the calcium concentration in the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum of skeletal muscle myotubes. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30372-30378.
- Saarma, M. 2009. GFL neurotrophic factors: physiology and pharmacology, p. 711. *In* M. D. Binder, N. Hirokawa and U. Windhorst (eds.), *Encyclopedia of Neuroscience*, 1<sup>st</sup> ed., Elsevier.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (10): 630–642.

- Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. A., Matsuyama, S. (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature Cell Biology* 5: 320-329.
- Schaiff, T. W., Hruska, K. A., McCourt, D. W., Green, M., Schwartz, B. D. (1992). HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *The Journal of Experimental Medicine* 176 (3): 657-666.
- Schmid, D., Baici, A., Christen, P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263 (5149): 971-973.
- Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., ... Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 59 (3): 301–315.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Developmental Cell* 3 (1): 99-111.
- Shin, B. K., Wang, H., Yim, A. M., ... Hanash, S. M. (2003). Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7607–7616.
- Sun, F.-C., Wei, S., Li, C.-W., Chang, Y.-S., Chao, C.-C., Lai, Y.-K. (2006). Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochemical Journal* 396 (1): 31-39.
- Terasaki, M., Jaffe, L. A. (1991). Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization. *The Journal of Cell Biology* 114 (5): 929–940.
- Terasaki, M., Slater, N. T., Fein, A., Schmidek, A., Reese, T. S. (1994). Continuous network of endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16): 7510–7514.
- Theyssen, H., Schuster, H.-P., Packschies, L., Bukau, B., Reinstein, J. (1996). GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Journal of Molecular Biology* 263 (5): 657-670.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101 (3): 249-258.
- Tsunemi, S., Nakanishi, T., Fujita, Y., Bouras, G., Miyamoto, Y., Miyamoto, A., Nomura, E., Takubo, T., Tanigawa, N. (2010). Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncology Reports* 23 (4): 949-956.

- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J., Zimmermann, R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13): 7214–7219.
- Vishnu, N., Khan, M. J., Karsten, F., Groschner, L. N., Waldeck-Weiermair, M., Rost, R., Hallström, S., Imamura, H., Graier, W. F., Malli, R. (2014). ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Molecular Biology of the Cell* 25 (3): 368-379.
- Voutilainen, M. H., Bäck, S., Peränen, J., Lindholm, P., Raasmaja, A., Männistö, P. T., Saarma, M., Tuominen, R. K. (2011). Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 228 (1): 99-108.
- Voutilainen, M. H., De Lorenzo, F., Stepanova, P., Bäck, S., Yu, L.-Y., Lindholm, P., Pörsti, E., Saarma, M., Männistö, P. T., Tuominen, R. K. (2017). Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action. *eNeuro* 4 (1): 1–14.
- Voutilainen, M. H., Bäck, S., Pörsti, E., Toppinen, L., Lindgren, L., Lindholm, P., Peränen, J., Saarma, M., Tuominen, R. K. (2009). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* 29 (30): 9651-9659.
- Walter, P., Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334 (6059): 1081-1086.
- Weitzmann, A., Baldes, C., Dudek, J., Zimmermann, R. (2007). The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *The FEBS Journal* 275 (19): 5175-5187.
- Wu, J., Vallenius, T., Ovaska, K., Westermarck, J., Mäkelä, T. P., Hautaniemi, S. (2009). Integrated network analysis platform for protein-protein interactions. *Nature Methods* 6 (1): 75 - 77.
- Xiao, G., Chung, T.-F., Pyun, H. Y., Fine, R. E., Johnson, R. J. (1999). KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Molecular Brain Research* 72 (2): 121–128.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107 (7): 881-891.

- Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T., Koizumi, A. (1997). A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46 (5): 887-894.
- Zhou, H., Zhang, Y., Fu, Y., Chan, L., Lee, A. S. (2011). Novel mechanism of anti-apoptotic function of 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78): endocrine resistance factor in breast cancer, through release of B-cell lymphoma 2 (BCL-2) from BCL-2-interacting killer (BIK). *The Journal of Biological Chemistry* 286 (29): 25687-25696.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E., Hendrickson, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272 (5268): 1606-1614.

### **Kasutatud veebiaadressid**

NanoTemper Technologies GmbH kodulehekülg. Kasutatud 18. aprill 2017.

<http://www.nanotemper-technologies.com/products/monolith-series/>

Parkinson's Disease Foundation. Kasutatud 1. märts 2017.

[http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics)

Protein Interaction Network Analysis (PINA) platform. Kasutatud 23. aprill 2017.

<http://omics.bjcancer.org/pina/home.do>

SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal. Kasutatud 28. aprill 2017.

<http://web.expasy.org/protparam/>

The Universal Protein Resource (UniProt). Kasutatud 28. aprill 2017.

<http://www.uniprot.org>

## **Lihtlitsents**

Mina, Kristofer Nõges (21.11.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Mesentsefaalse astrotsüütidest pärineva närvikasvufaktori (MANF) interaktsioonid šaperoniga BiP ning madalmolekulaarsete ühenditega”, mille juhendajad on Ave Eesmaa, professor Mart Saarma ja professor Ülo Langel
- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 20.05.2017